Zytostatikawirkungen auf die Nukleinsäure- und Proteinsynthese von funktionell gereizten und pathologischen Lymphknoten

GÜNTER STOCKHUSEN

1967

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546019_0095

AUS DER I.MEDIZINISCHEN ABTEILUNG DES STÄDT.KRANKENHAUSES
MÜNCHEN SCHWABING
CHEFARZT PROFESSOR DR.H.BEGEMANN

ZYTOSTATIKAWIRKUNGEN AUF DIE NUKLEINSÄURE- UND PROTEIN-SYNTHESE VON FUNKTIONELL GEREIZTEN UND PATHOLOGISCHEN LYMPHKNOTEN

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und

einer hohen medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

GÜNTER STOCKHUSEN

aus Waiblingen

München 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Berichterstatter : Prof. Dr. H. Begemann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Seitz
Dekan : Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündl. Prüfung : 12. 12. 1967

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINFÜHRUNG Seite 1

B. MATERIAL UND METHODEN

I. Lymphknoteninkubation 3

II. Autoradiographie 5

III. Auswertung 6

IV. Zytostatika 8

1. Stickstofflost
2. Ibenzmethyzin
3. Actinomycin
4. Vinblastin
5. Prednisolon

C. ERGEBNISSE

I. Lymphogranulomatosen 11

II. Retikulosarkome 27

III. Lymphadenosen 34

IV. Hyperplasien 38

V. Zytostatische Beeinflussung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese aller malignen Lymphome 39

VI. Zusammenfassender Vergleich der gemeinsamen in-vitro- und in-vivo-Fälle 43

D. DISKUSSION

I. Fehlermöglichkeiten der Methode 45

II. Wirkungsmechanismus der Zytostatika 48

III. Theoretische Möglichkeiten für die Hemmung der Zellproliferation durch Zytostatika 51

IV. Vergleich der Effekte der verschiedenen Zytostatika 56

V. Der klinische Wert der Kurzzeitinkubation mit zytostatischen Substanzen 61

E. ZUSAMMENFASSUNG 63

LITERATURVERZEICHNIS 65

A. Einführung

Neben der Behandlung maligner Tumoren mit Operation und Bestrahlung, hat sich eine dritte Methode als erfolgversprechend erwiesen: die Chemotherapie mit zytostatischen Substanzen. Die klinische Erfahrung hat gezeigt, daß die meisten der heute bekannten Zytostatika bei lymphoproliferativen Erkrankungen wesentlich sicherer wirken als bei anderen malignen Tumoren des Bindegewebes oder des Epithels.

Insbesondere gilt das für die Lymphogranulomatose, das Lympho- und Retikulosarkom und für die lymphatische Leukämie. (8,2o,36,51,53,54,68,1o6).

Alle Zytostatika scheinen trotz ihrer verschiedenen chemischen Strukturen eine gemeinsame Grundwirkung zu besitzen: sie greifen in die Vorbereitung oder den Ablauf der Mitose ein und hemmen dadurch die Proliferation der neoplastisch entarteten Zellen.

Leider üben sie keine selektive Hemmung auf pathologische Zellen aus. Schon in therapeutischen Dosen muß gleichzeitig mit einer Funktionsstörung der normalen, insbesondere der rasch wachsenden Zellen und Gewebe (blutbildendes System, Darmschleimhaut und andere Organe) gerechnet werden. Dadurch werden die therapeutischen Möglichkeiten eingeschränkt. Hinzu kommt noch eine primär vorhandene oder sekundär erworbene Resistenz einer Geschwulst gegenüber bestimmten Zytostatika.

Um einerseits das wirksamste Zytostatikum für bestimmte Tumoren auszutesten, andererseits eine eventuelle

Resistenz festzustellen, wäre eine in-vitro-Prüfung ähnlich der Testung von Antibiotika gegen Mikroorganismen notwendig.

Die ersten Zytostatikaprüfungen in vitro sind bereits ausgearbeitet worden und wurden mit ermutigenden Ergebnissen bei verschiedenen malignen Tumoren (13,1o5,1o6), bei akuten Leukosen (1o3) und bei gynäkologischen Tumoren (67) angewandt.

Da die klinischen Erfolge der Zytostatikatherapie besonders bei malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems zu verzeichnen sind, jedoch keine sicheren Anhaltspunkte über den Wirkungsmechanismus in pathologischen Lymphknotenzellen vorliegen, wurde in dieser Arbeit versucht, den Zytostatikaeffekt in funktionell gereizten und pathologischen Lymphknotenzellen zu analysieren.

Nachdem in neuerer Zeit durch die Markierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) mit H^3-Thymidin wesentliche Einblicke in die Zellproliferation gewonnen werden konnten und auch in vorhergehenden Arbeiten (99) der Nukleinsäurestoffwechsel und die Proliferationsverhältnisse von Lymphknotenzellen untersucht wurden, erschien es sinnvoll, mit ähnlicher Methode den Einfluß von zytostatischen Substanzen auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese in den Lymphknotenzellen zu prüfen, da die ständige Neuproduktion von Kern- und Zytoplasmamaterial die wichtigste Voraussetzung der Zellproliferation ist.
Gleichzeitig wurde versucht, in einzelnen Krankheitsfällen die experimentellen Befunde mit der klinischen Wirkung einiger Zytostatika zu vergleichen.

B. Material und Methoden

Untersucht wurden 4o Lymphknoten, die aus diagnostischen Gründen durch Operation entweder in Lokal- oder Allgemeinnarkose von unbehandelten Patienten gewonnen wurden. Dabei handelt es sich in der Mehrzahl der Fälle um zervikale Lymphknoten. Vereinzelt wurden auch axillare und inguinale Lymphome exstirpiert. Die Operationsdauer betrug je nach Lageverhältnissen 15 - 3o Minuten.
Die frisch exstirpierten Lymphknoten wurden in einer mit Ringerlösung gefüllten Petrischale von lymphknotenfremdem Gewebe und Kapsel freipräpariert. Ein Teil des Organs wurde zur histologischen Untersuchung formolfixiert.
Der Rest wurde mit einer feinen Schere zu Partikelgrößen von ca. 1 mm^3 zerkleinert, zur Bestimmung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese in vorbereitete 25 ml-Erlenmeyerkolben gebracht und inkubiert.

Die Erlenmeyerkolben enthielten folgendes Kulturmedium: Patientenserum o,6 ml, gepufferte Ringer-Glukoselösung 1,o ml (Glukoseendkonzentration im Kulturmedium 2oo mg%; pH 7,4), Zytostatikum, gelöst in o,2 ml Ringerlösung , tritiummarkierte Zellbausteine in o,2 ml Ringerlösung: für die DNS-Synthese Thymidin-6-H^3, spezifische Aktivität 5 C/mM; für die RNS-Synthese Cytidin-5-H^3, spezifische Aktivität 1,o6 C/mM, bzw. Uridin-5-H^3, spezifische Aktivität 5 C/mM; für die Proteinsynthese l-Leucin-4,5-H^3, spezifische Aktivität o,96 C/mM.

Die Endkonzentration im Medium betrug bei den H^3-

Nukleosiden 1 µC/ml, bei der H^3-Aminosäure 2 µC/ml. Cytidin wird während einer Stunde in Hela-Zellkulturen zu 95% in die RNS und nur zu 5% in die DNS eingebaut (FEINENDEGEN,3o).
Uridin ist nach HAYHOE(5o) ein spezifischer RNS-Baustein.

Die tritiummarkierten Substanzen wurden vom Radiochemical Centre Amersham, England, hergestellt und durch die Firma Buchler, Braunschweig, bezogen.

Die Kontrollgläschen enthielten statt des Zytostatikums o,2 ml Ringerlösung.

Sofort nach Zugabe der H^3-Nukleoside und der H^3-Aminosäure wurden die Kulturgläschen in einem Wärmeschrank bei 37°C für 6o Minuten inkubiert, Dabei wurde der Inkubator fortwährend geschüttelt, so daß die Gewebepartikelchen immer von einer gleichbleibenden Mischung des Mediums überspült wurden. Gleichzeitig wurde Sauerstoff zugeführt, um die Vitalität der Zellen zu erhalten.

Bei einigen Lymphknoten wurde die Inkubationszeit auf 3 Stunden verlängert, um zu sehen, ob sich durch die Verlängerung eine Steigerung der Zytostatikaeffekte erzielen läßt.

Die Vorbereitungszeit zwischen Exstirpation und Inkubationsbeginn betrug 1o - 2o Minuten. Nach Beendigung der Schüttelinkubation wurden die Gewebepartikel in Ringerlösung gewaschen und auf saubere durch Alkohol/Äthergemisch entfettete Objektträger mit einer feinen Pinzette locker ausgestrichen oder ausgetupft, so daß nur die oberflächlichen Zellschichten verwendet wurden.

Die luftgetrockneten Präparate wurden dann für 2 x 15 Minuten in Methanol fixiert und anschließend für 24 Stunden gewässert, um noch anwesende ungebundene H^3-Vorläufer aus den Ausstrichen zu entfernen. Danach wurden die Präparate wieder im Luftstrom getrocknet und für die Autoradiographie vorbereitet.

II. Autoradiographie

Um die tritiummarkierten H^3-Nukleoside, die im Verlauf der 1-stündigen Inkubation in die Zellen eingebaut wurden, sichtbar zu machen, verwendeten wir die Stripping-Film-Methode nach BOYD (16), PELC (81) und HARBERS (44), modifiziert nach FLIEDNER (31).

Es wurden hierzu "Kodak Autoradiographic Stripping Plates AR 1o" benutzt. Die Präparate wurden vorher kurz in Chromalaun-Gelatine (5,o Gelatine, o,5 Chromalaun ad 1ooo,o aqua dest.) getaucht und sodann in der Dunkelkammer bei einer 8 W Lichtquelle hinter einem roten "Kodak safelight Filter Wratten Series 1" mit zurechtgeschnittenen Filmen überzogen, im Luftstrom getrocknet und danach in lichtdichten Kunststoffkästen bei $4^{o}C$ für 14 Tage exponiert.

Während dieser Expositionszeit reduziert die Beta-Strahlung des Tritiums das Silberchlorid der Filmemulsion, so daß durch fotographische Entwicklung Silberkörner überall dort sichtbar gemacht werden können, wo Tritium in die Zellen eingebaut wird.

Die Präparate wurden für 5 Minuten in Kodak Formula D-19b High-Contrast Negative Developer entwickelt und nach einem 1o - 2o Sekunden dauernden Zwischenbad in destilliertem Wasser für 1o Minuten in Kodak Acid Fixer Powder-Lösung fixiert. Anschließend folgte eine 3o-minütige Wässerung. Nach Lufttrocknung wurden die Präparate in eine Pufferreihe (pH 5,7 aus Zitronensäure und Na_2HPO_4) und 96 %igen Alkohol in folgender Anordnung gebracht: Puffer/Alkohol 1:1, Alkohol, Puffer, Puffer/Alkohol 1:1, Alkohol, Puffer, Puffer (pro Behälter 3 Minuten).
Danach wurden die Präparate durch den Strippingfilm hindurch 5o Minuten lang nach Giemsa gefärbt (1o ml der Giemsa-Stammlösung der Fa. Merck AG, auf 1oo ml Zitronensäure/Na_2HPO_4-Puffer, pH 5,7), 5 Minuten mit dem Puffergemisch nachdifferenziert, um überschüssige Farbe aus der Filmschicht zu eliminieren, und schließlich im kühlen Luftstrom getrocknet.

III. Auswertung

Zunächst wurden in den gefärbten Präparaten 1ooo Zellen differenziert, um die verschiedenen zellulären Anteile des jeweiligen Lymphknotens zu erhalten (Adenogramm nach LENNERT, 65).
Wir bestimmten die verschiedenen Zelltypen im wesentlichen nach der zytologischen Einteilung LENNERT's (65).
Danach lassen sich folgende Zelltypen unterscheiden:

Lymphatische Retikulumzellen oder basophile Stammzellen,
basophile Rundzellen oder Germinoblasten,
Plasmoblasten,
undifferenzierte Retikulumzellen,
große differenzierte Retikulumzellen,
mittlere differenzierte Retikulumzellen, diese entsprechen den Lymphoblasten,
große und kleine Lymphozyten,
Plasmazellen,
und bei den entsprechenden lymphoproliferativen Erkrankungen Hodgkinzellen, Sternbergsche Riesenzellen, Sarkomzellen.
Eine ausführlichere Beschreibung dieser Lymphknotenzellen findet sich an anderer Stelle (99).

Sodann wurde an je 1oo Zellen eines vorhandenen Zelltyps der Markierungsindex, d.h. der prozentuale Anteil der markierten Zellen, und die Markierungsintensität, d.h. die Zahl der Silberkörner über jeder markierten Zelle, bestimmt.

Durch Multiplikation von Markierungsindex, Markierungsintensität und Zahl des jeweiligen Zelltyps pro 1ooo Lymphknotenzellen bestimmten wir den Synthese-Index des Zelltyps für die DNS-, RNS- und Proteinsynthese.
Durch Addition der Synthese-Indices aller Zelltypen eines Lymphknotens kann man den Synthese-Index des jeweiligen Lymphknotengewebes ermitteln.

Durch Vergleich des Synthese-Index des Kontrollansatzes mit dem der verschiedenen Zytostatikaansätze ließ

sich der Einfluß der einzelnen Medikamente auf den Nukleinsäure- und Proteinstoffwechsel zeigen.

Da in einzelnen Präparaten aus einem Lymphknoten auch ohne Zytostatika Schwankungen in der Markierung bis zu ± 2o % vorkamen, wurden nur Veränderungen der Einbaurate um mehr als 2o% als zytostatischer Effekt gewertet.

Von den 4o exstirpierten menschlichen Lymphknoten wurden 26 ausgewertet. Die histologische und zytologische Diagnose ergab dabei:

8 Lymphogranulomatosen
5 Retikulosarkome
4 Lymphadenosen
9 reaktive Lymphknotenhyperplasien.

14 Lymphknoten konnten nicht ausgewertet werden, da das Gewebe entweder induriert und zellarm war oder nach Entwicklung der Autoradiographien keine Markierung ergab oder der autoradiographische Nulleffekt eine sichere Auswertung unmöglich machte.

IV. Zytostatika

Folgende zytostatische Substanzen wurden untersucht:

1. Stickstoff-Lost (Sinalost = Trichlortriäthylaminhydrochlorid) als alkylierendes Zytostatikum, dessen Wirkung klinisch vielfältig erprobt wurde (1,39,4o,1o7). Dosis I = o,ooo1 mg/ml, das entspricht einer mittleren bis hohen klinischen Dosis von o,o6 mg/kg Körpergewicht. Dosis II = o,oo1 mg/ml (1o-fache Konzentration

von Dosis I). Auch diese Konzentration scheint therapeutisch anwendbar zu sein. Es wurden schon 1 mg/kg Körpergewicht Stickstoff-Lost appliziert (23).

2. Ibenzmethyzin (Natulan), ein zytostatisch wirksames Methylhydrazinderivat (p-(N'-Methyl-hydrazinomethyl)-N-isopropyl-benzamid-hydrochlorid): Dosis I = o,o1 mg/ml, das entspricht einer hohen, aber klinisch verwendbaren Dosis von 6,5 mg/kg Körpergewicht.
Dosis II = o,1 mg/ml.

Über Natulan liegen bereits eine Anzahl von klinischen Ergebnissen vor. Danach werden besonders die lymphoproliferativen Erkrankungen positiv beeinflußt (Literaturübersicht bei BEGEMANN et al, 9).

3. Actinomycin C (Sanamycin) ein aus Streptomyces chysomallus gewonnenes Antibiotikum, das 1949 von BROCKMANN (18) isoliert, von HACKMANN (43) als antineoplastisch befunden wurde und seitdem insbesondere für die Lymphogranulomatose therapeutische Anwendung findet (7,8,92).
Dosis I = o,oo5 µg/ml, Dosis II = o,o5 µg/ml, das entspricht einer therapeutischen Einzeldosis von 3,5 µg/kg Körpergewicht.

4. Vinblastin (Velbe), ein Alkaloid aus Vinca rosea, das vor allem bei der Therapie der Lymphogranulomatose verwendet wird (FAIRLEY, 29).
Dosis I = o,ooo4 mg/ml, entsprechend einer therapeutischen Dosis von o,24 mg/kg Körpergewicht.
Dosis II = o,oo4 mg/ml.

5. Prednisolon (Decortin H), ein Cortisonderivat, das sich wie alle Glukokortikoide in der Therapie lymphatischer Systemerkrankungen bewährt hat.
   Dosis I = o,oo1 mg/ml, das entspricht einer klinischen Dosis von o,7 mg/kg Körpergewicht,
   Dosis II = o,o1 mg/ml,
   Dosis IV = 1,o mg/ml. Die zwischen diesen beiden Konzentrationen liegende Dosis III wurde nicht verwendet.

Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich nicht auf das gesamte Körpergewicht, sondern nur auf die Körperflüssigkeit, d.h. ca. 6o% des Körpergewichtes.

C. Ergebnisse

Die einzelnen mit verschiedenen Zytostatika behandelten Lymphknoten werden in der folgenden Darstellung nach Krankheitsgruppen geordnet.

I. Lymphogranulomatosen

Fall 1: Untersucht wurden Ibenzmethyzin, Sinalost und Decortin H in der Dosis I.
Es konnten nur geringe Veränderungen (unter 2o% des Kontrollwertes) festgestellt werden, die noch innerhalb der Fehlerbreite der Methode lagen. Auffällig war dabei jedoch die Konstanz, mit der unter Ibenzmethyzineinwirkung bei allen Zelltypen eine Verminderung des Thymidineinbaues erfolgte.

Die RNS-Synthese zeigte sich weitgehend unbeeinflußt. Lediglich ließ sich unter Natulan eine geringe Verminderung der Silberkornzahl zeigen.

Epikrise: Dieser Lymphknoten eines 23-jährigen Patienten mit frischer, florider, unbehandelter Lymphogranulomatose sprach bei der in-vitro-Testung auf die oben angeführten lymphotoxischen Substanzen nicht sicher an.

Fall 2: Untersucht wurden Ibenzmethyzin, Sinalost und Decortin H in der den therapeutischen Verhältnissen entsprechenden Dosis I.
Es zeigte sich ein deutlich verminderter Thymidineinbau unter Zytostatikaeinfluß. Das lympho-

toxische Hormon Prednisolon war in dieser niedrigen Dosis unwirksam. Ibenzmethyzin hatte bei allen Zellen mit einer hohen Einbaurate (lymphatische Retikulumzelle, große differenzierte Retikulumzelle, Hodgkinzelle, basophile Rundzelle) einen stärkeren Effekt als Sinalost. Dabei reduzierte Ibenzmethyzin nicht nur den Prozentsatz markierter Zellen um durchschnittlich 5o%, sondern auch die mittlere Kornzahl. Sinalost senkte den Prozentsatz markierter Zellen dagegen nur um durchschnittlich 25%. Die Silberkornzahl blieb unbeeinflußt.

Am deutlichsten war der zytostatische Effekt bei der lymphatischen Retikulumzelle, der Hodgkinzelle und der großen differenzierten Retikulumzelle, während der Plasmoblast und die basophile Rundzelle kaum beeinflußt wurden.

Der Cytidineinbau wurde durch Ibenzmethyzin und Sinalost nur geringgradig verändert.

Die Abbildung 1 gibt diese Verhältnisse in Form einer graphischen Darstellung wieder.

Vergleicht man die Nukleinsäure-Indices, so ergibt sich: Die DNS-Synthese wurde in diesem Lymphknoten durch Stickstofflost um 36% und durch Ibenzmethyzin um 66% reduziert. Prednisolon hatte keinen Effekt. Die RNS-Synthese blieb bei allen Substanzen unbeeinflußt.

Epikrise: Im in-vitro-Test erwies sich der Lymphknoten eines 3o-jährigen Patienten mit frischer Lymphogranulomatose als überaus ibenzmethyzin- und mittelgradig lostempfindlich. Da der granulomatöse Prozeß noch streng

auf die Zervikalregion lokalisiert war, wurde der Patient nicht mit Zytostatika, sondern mittels Strahlentherapie behandelt.

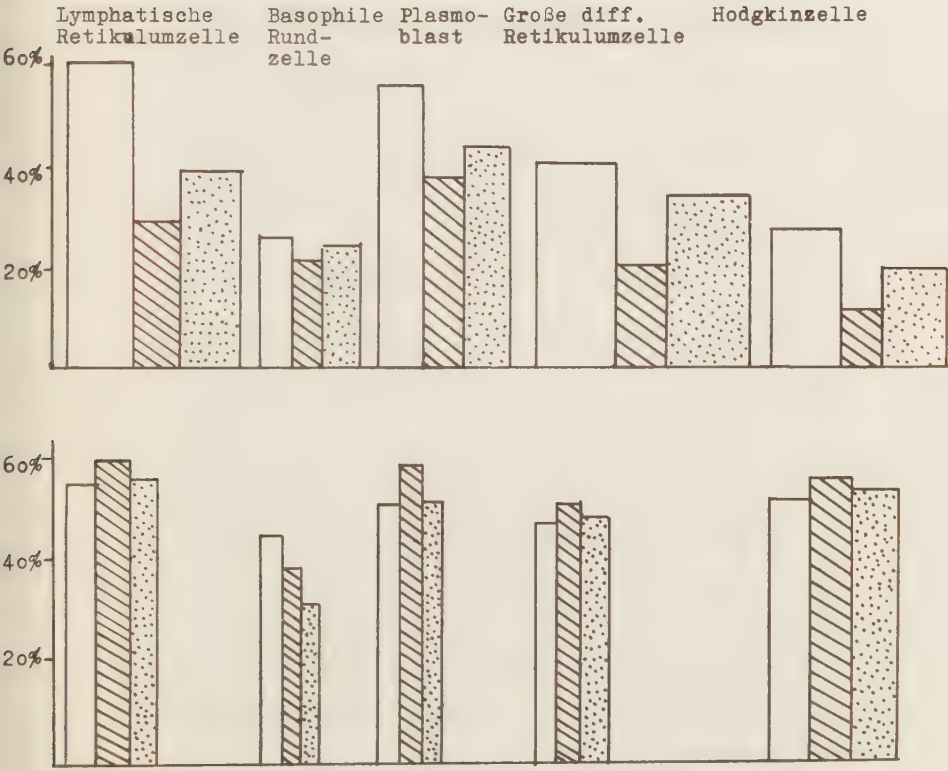


Abb.1 Adenogramm eines Lymphknotens (Lymphogranulomatose) für die DNS-Synthese (oben) und für die RNS-Synthese (unten). Die Höhe der Säulen gibt den Markierungsindex in Prozent an, die Breite der Säulen die Markierungsintensität (Silberkornzahl).

Kontrollwert Ibenzmethyzin Sinalost

Fall 3: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II, Sinalost Dosis II, Actinomycin Dosis I und II, Vinblastin Dosis I und II, Decortin H Dosis II.
Die DNS-Synthese ließ sich insbesondere durch Ibenzmethyzin deutlich vermindern. Der Nukleinsäure-Index betrug 49% vom Kontrollwert, d.h. die gesamte DNS-Synthese pro 1ooo Lymphknotenzellen wurde durch Natulan um 51% reduziert, die RNS-Synthese um 2o%. Dabei fiel wieder die besondere Empfindlichkeit der lymphatischen Retikulumzellen und der Hodgkinzellen auf, ähnlich wie es in Abb.1 von Fall 2 gezeigt wird.

Actinomycin C, Dosis II, verminderte die Thymidineinbaurate nur um 9%, die Cytidineinbaurate jedoch um 32%. Mit der Dosis I wurde mit 5% RNS-Hemmung kein Effekt erzielt.

Epikrise: Der Lymphknoten der 39-jährigen Patientin mit frischer, unbehandelter Lymphogranulomatose erwies sich als stark natulanempfindlich und mäßig stark actinomycinempfindlich, während alle anderen getesteten Substanzen weder die DNS- noch die RNS-Synthese beeinflußten. Auch diese Patientin wurde der Strahlentherapie zugeführt.

Fall 4: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I und II und als besonders niedrige Konzentration die Hälfte von Dosis I, Sinalost Dosis I und II, Actinomycin Dosis II, Vinblastin Dosis II, Decortin Dosis I und II.

Die DNS-Synthese wurde durch Ibenzmethyzin um 66% -7o%, durch Stickstofflost um ca. 4o% eingeschränkt. Vinblastin und Decortin Dosis I hatten keinen Effekt auf die Nukleinsäuresynthese. Actinomycin und Decortin Dosis II senkten die DNS-Synthese nicht, die RNS-Synthese jedoch um 3o%.

Abbildung 2 zeigt den Einbau von H^3-Thymidin während der 1-stündigen Inkubation ohne Zytostatikawirkung und nach Ibenzmethyzin.

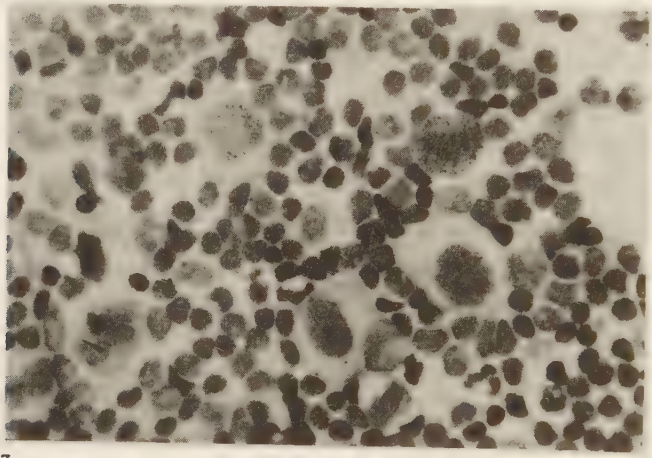
Auffällig war, daß die Dosis I von Natulan praktisch ebenso wirksam war wie die stärkere Dosis II. Lediglich die mittlere Silberkornzahl wurde durch die Dosis II stärker vermindert als durch die Dosis I.

Der Sinalosteffekt erstreckte sich wie bei Fall 1 nur auf den Markierungsindex, nicht auf die Markierungsintensität.

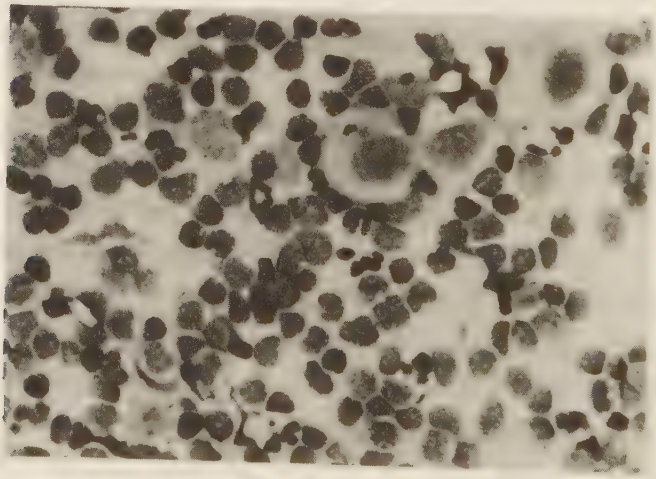
Die lymphatischen Retikulumzellen und die Hodgkinzellen erwiesen sich wiederum als wesentlich empfindlicher als die Plasmoblasten und die basophilen Rundzellen.

Ein interessantes Ergebnis der Ibenzmethyzinwirkung zeigte ein Vergleich der 3 verschiedenen Konzentrationen. Abbildung 3 veranschaulicht in einer graphischen Darstellung das Ergebnis. Aufgezeichnet sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für die DNS-Synthese aller synthetisierenden Zellen im Lymphknoten und für die DNS-Synthese der Hodgkinzellen. Die Kurven haben einen ähnlichen biphasischen Verlauf: Die niedrigste Ibenzmethyzinkonzentration von o,oo5 mg/ml, das entspricht einer therapeutischen Dosis

Abb. 2. Zytologisches Lymphknotenpräparat einer Lymphogranulomatose (Fall 4).



H^3-Thymidineinbau ohne Zytostatikum. Markiert sind 4 Hodgkinzellen.



H^3-Thymidineinbau nach Ibenzmethyzineinwirkung (D II). Markiert ist eine lymphatische Retikulumzelle, 4 Hodgkinzellen sind unmarkiert.

von 225 mg/ 7o kg Körpergewicht, bewirkte nur eine geringe Abnahme des H^3-Thymidineinbaus. Bei o,o1 mg/ml, das entspricht einer klinischen Dosis von 45o mg, kam es zu einem starken Abfall der DNS-Synthese. Die stärkste Dosis von o,1 mg/ml Ibenzmethyzin bewirkte dann nur noch eine ganz geringe Steigerung der Hemmwirkung auf den Nukleosideinbau.

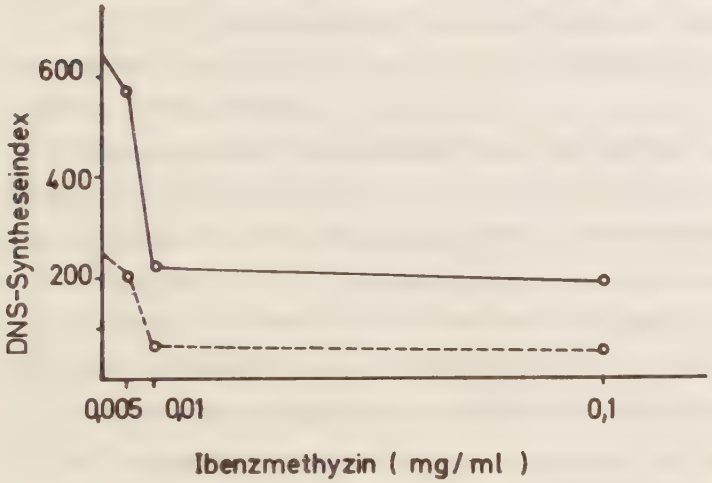


Abb. 3. Dosis-Wirkungs-Kurve für 3 Ibenzmethyzin-Konzentrationen bei einem Lymphogranulomatose-Lymphknoten.
Veränderungen der DNS-Synthese pro 1ooo Lymphknotenzellen (ausgezogene Kurve) und der DNS-Synthese der Hodgkinzellen (gestrichelte Kurve).

Epikrise: Dieser Lymphknoten wurde ein halbes Jahr später von Fall 1 in einem fortgeschrittenen Stadium der Lymphogranulomatose exstirpiert, nachdem durch Bestrahlung des Mediastinums und der linken Zervikalregion zunächst ein Rückgang der Lymphome eingetreten war. Das Zellbild sah jetzt histologisch und zytologisch wesentlich "maligner" aus. Die großen differenzierten Retikulumzellen, die Hodgkinzellen und die Sternbergschen Riesenzellen hatten zugenommen und bestimmten das Zellbild.

Interessanterweise zeigte sich nun nach Zytostatikaaustestung eines Lymphknotens ein deutlicher Hemmeffekt auf die DNS-Synthese. Dabei wirkte Ibenzmethyzin mit 66 - 7o% Reduktion doppelt so stark wie Sinalost. Actinomycin bewirkte eine leichte Hemmung des H^3-Uridineinbaus, alle anderen getesteten Medikamente waren wirkungslos.

Da der in-vitro-Test für Ibenzmethyzin positiv ausfiel, wurde ein Therapieversuch mit diesem Zytostatikum unternommen. Es bewirkte eine mehrmonatige Remission.

Fall 5: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II und Sinalost Dosis II.

Ibenzmethyzin bewirkte eine Verminderung der Einbaurate für H^3-Thymidin um 62%, für H^3-Uridin um 5o%. Auf den H^3-Leucineinbau hatte es keinen Einfluß, da eine Verminderung um 14% noch im Bereich der methodischen Fehlergrenze liegt. Sickstofflost zeigte weder auf den Nukleosid- noch auf den Aminosäureeinbau eine Wirkung.

Am stärksten wurde der Einbau in die lymphatische Retikulumzelle gehemmt. Alle übrigen Zellelemente des Lymphknotens zeigten nur eine sehr geringe Beeinflußbarkeit durch die verwendeten Zytostatika.

Epikrise: Dieser Lymphknoten eines 61-jährigen Patienten mit mäßig florider Lymphogranulomatose (das Lymphknotengewebe war zum größten Teil bindegewebig infiltriert, im Adenogramm ließen sich nur wenige Stammzellen feststellen) sprach sowohl in der DNS- als auch in der RNS-Synthese auf Ibenzmethyzin an. Auf die Proteinsynthese hatte es keinen Einfluß.

Auch dieser Patient wurde mit Natulan (insgesamt 8oo mg als Infusion) behandelt. Für kurze Zeit konnte eine Remission mit deutlicher Rückbildung der Lymphome erreicht werden.
Das Stickstofflost-Derivat Cyclophosphamid (Endoxan) bewirkte keine Remission.

Fall 6: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II und Sinalost DosisII.
Ibenzmethyzin hatte eine Hemmwirkung auf die DNS-Synthese und auf die RNS-Synthese um 6o%. Die Proteinsynthese wurde nicht beeinflußt. Stickstofflost führte zu einem gesteigerten H^3-Thymidineinbau. Der Nukleinsäure-Index betrug 19% mehr als der Nukleinsäure-Index des Kontrollwertes. Jedoch wurde diese Steigerung nicht als Effekt gewertet, da die Fehlergrenze bei $\pm$ 2o% liegt.

Die RNS-Synthese wurde durch Sinalost um 29% gesenkt. Bei der lymphatischen Retikulumzelle, der Hodgkinzelle und auch bei der basophilen Rundzelle waren sowohl der Markierungsindex als auch die Markierungsintensität für die DNS- und die RNS-Synthese durch Ibenzmethyzin deutlich vermindert.

Die Sinalost- Wirkung auf den Uridineinbau der einzelnen Zelltypen war sehr verschieden. Nur die Summe aller Einzelwirkungen ergab einen leichten Effekt. (29% ige Hemmwirkung).

Epikrise: Der Lymphknoten der 22-jährigen Patientin erwies sich in vitro als hochgradig ibenzmethyzinempfindlich und auch in vivo konnte eine gute und langanhaltende Remission erzielt werden. Sinalost hatte in vitro nur einen schwachen Effekt.Auch in vivo bewirkte Cyclophosphamid, welches vor der Natulantherapie versucht wurde, nur eine kurze Remission.

Fall 7: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I und II; Sinalost Dosis I und II; Actinomycin Dosis II. Bei diesem Fall wurde neben der üblichen einstündigen Inkubation außerdem eine vierstündige Inkubation durchgeführt, um zu sehen, ob mit Zunahme der Inkubationszeit auch eine Zunahme der zytostatischen Hemmwirkung einhergeht. Ibenzmethyzin Dosis I beeinflußte dabei die DNS-Synthese mit 9% iger Senkung nur gering.Die Dosis II jedoch bewirkte eine deutliche Verminderung des Nukleinsäureindex um 59%. Auch der Markier-

ungsindex und die mittlere Silberkornzahl wurden besonders bei der lymphatischen Retikulumzelle, der Hodgkinzelle und dem Plasmoblasten hemmend beeinflußt. Sowohl die RNS- als auch die Proteinsynthese wurden nicht, bzw. mit Dosis II nur unwesentlich (17%) beeinflußt.

Sinalost senkte bereits in der niedrigen Dosis I die DNS-Synthese um 44%, eine Steigerung der Hemmwirkung durch Dosis II fand nicht statt.

Die RNS- und die Proteinsynthese wurden durch beide Cytostatika nur zweifelhaft reduziert. Sinalost hemmte hauptsächlich den Nukleosideinbau der lymphatischen Retikulumzelle.

Actinomycin C zeigte mit 51% iger Hemmwirkung der RNS- Synthese einen ausgezeichneten Effekt. Auch auf die Protheinsynthese hatte dieses Medikament mit 26% eine mäßige Wirkung.

Die 4- Stundenwerte zeigten in der zytostatischen Beeinflussung keine wesentlichen Veränderungen. Lediglich der Nukleinsäureindex aller synthetisierenden Zellen des untersuchten Lymphknotengewebes stieg etwas an.

Epikrise: Der Lymphknoten des 63- jährigen Patienten zeigte in vitro eine gute Empfindlichkeit gegenüber Stickstofflost, Ibenzmethyzin und Actinomycin. Auch die Ibenzmethyzinbehandlung war erfolgreich: es trat eine mehrmonatige Remission ein.

Fall 8: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I und Sinalost Dosis I.

In einem ersten Versuch wurde die übliche einstündige

Inkubation mit den Zytostatika und mit H^3- Nukleosiden durchgeführt. In einem zweiten Versuch wurde zunächst eine einstündige Vorinkubation nur mit den Zytostatika angesetzt. In der zweiten Inkubationsstunde wurden dann die H^3- Nukleoside hinzugegeben.

Bei üblicher Inkubation hatten Ibenzmethyzin und Stickstofflost keinen Einfluß auf den Thymidineinbau. Der RNS-Stoffwechsel wurde nur durch Ibenzmethyzin gehemmt, und zwar um 55%, der Aminosäureeinbau durch Ibenzmethyzin um 3o% und durch Sinalost um 5o%.

Bei der DNS- Synthese kam es jedoch nach einstündiger Vorinkubation und daran anschließender Inkubation mit H^3- Thymidin zu einer markanten Senkung durch Ibenzmethyzin um 61% und durch Sinalost um 52%, wobei der Markierungsindex und die Markierungsintensität sowohl der lymphatischen Retikulumzelle und der großen differenzierten Retikulumzelle als auch der basophilen Rundzelle und des Plasmoblasten vermindert waren. Die Wirkung auf die RNS-Synthese war gegenüber der normalen Inkubation unverändert.

Epikrise: Der Lymphknoten einer 32- jährigen Patientin mit mäßig stürmisch verlaufender Lymphogranulomatose sprach nach Modifikation des in- vitro- Versuches gut auf Natulan und Sinalost an. Wegen der geeigneten Lokalisation der Lymphome am Hals wurde das gesamte Lymphknotenkonglomerat chirurgisch entfernt.

Abb. 4 und 5 zeigen die Durchschnittswerte aller Lymphogranulomatosefälle in ihrer DNS-/RNS-Synthesekorrelation und RNS-/Protein- Synthesekorrelation.

Danach läßt sich zusammenfassend sagen, daß das lymphogranulomatöse Gewebe im allgemeinen sehr empfindlich auf Zytostatika reagiert. Dabei wurde die DNS- Synthese durch Ibenzmethyzin in 7 von 8 Fällen vermindert, in 3 Fällen die RNS- Synthese und in einem Fall die Proteinsynthese.

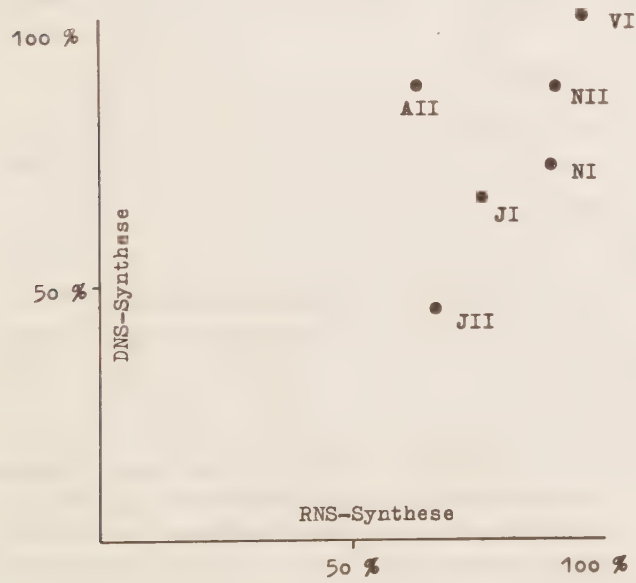


Abb. 4: Durchschnittlicher Effekt verschiedener Zytostatika und deren Konzentrationen auf die DNS- und RNS- Synthese der Lymphknoten bei Lymphogranulomatose (Fall 1 bis 8).
Kontrollwert = 100%
N = Stickstofflost
V = Vinblastin
J = Ibenzmethyzin
A = Actinomycin C
P = Prednisolon
I = Normaldosis
II= zehnfache Normaldosis

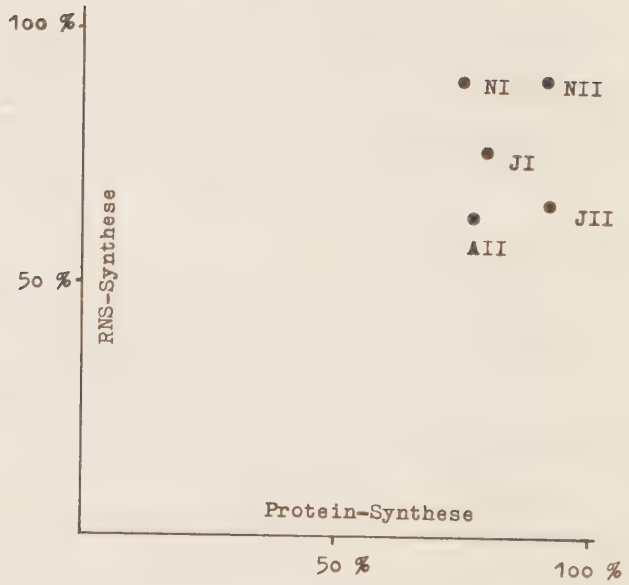


Abb. 5: Durchschnittlicher Effekt verschiedener Zytostatika und deren Konzentrationen auf die RNS- und die Proteinsynthese der Lymphknoten bei Lymphogranulomatose (Fall 1 bis 8, Zeichenerklärung Abb.1)

Stickstofflost reduzierte in 4 von 8 getesteten Lymphknoten die DNS- Synthese; einmal wurde der RNS- Stoffwechsel hemmend beeinflußt. Die Eiweißsynthese wurde in keinem Fall wirksam vermindert. In einem Fall hatten Ibenzmethyzin und Sinalost nach üblicher Inkubation keinen Effekt, erst nach einstündiger Vorinkubation zeigte sich eine deutliche Senkung der DNS- Synthese durch diese Zytostatika.

Actinomycin C hemmte in allen untersuchten Fällen nur die RNS- Synthese, einmal wurde die Proteinsynthese leicht reduziert. Der DNS- Stoffwechsel wurde nicht beeinflußt. Vinblastin und Prednisolon hatten in beiden Konzentrationen keine Wirkung auf die Nukleinsäure- und Protheinsynthese.

Bei allen Lymphogranulomatosefällen wurden sowohl der Markierungsindex als auch die Markierungsintensität besonders durch Ibenzmethyzin auffallend vermindert. Von den einzelnen differenzierten Zelltypen erwiesen sich immer wieder die lymphatische Retikulumzelle und die für diese Krankheitsgruppe spezifische Hodgkinzelle am empfindlichsten gegenüber Zytostatika. Auch war der Einfluß auf den Markierungsindex und die Markierungsintensität gerade bei diesen Zellen sehr ähnlich.(Abb. 6).

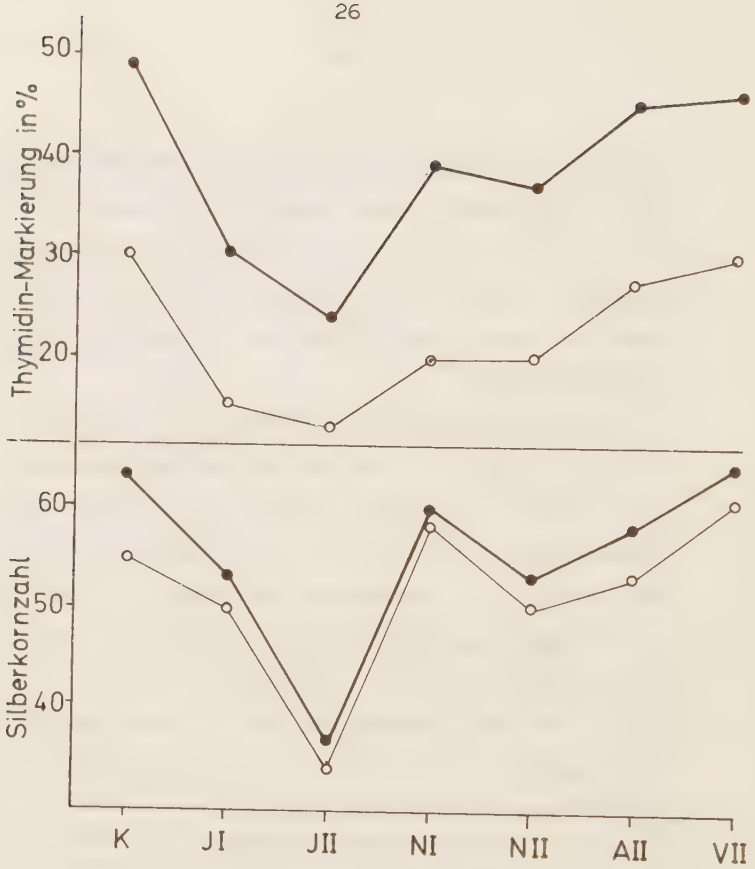


Abb. 6 Verminderung des Markierungsindex (oben) und der mittleren Silberkornzahl (unten) durch die Zytostatika und deren verschiedenen Konzentrationen bei der lymphatischen Retikulumzelle (schwarze Punkte) und der Hodgkinzelle (weiße Punkte) aller Lymphogranulomatose-Fälle.
Die Linien zwischen den einzelnen Punkten stellen keine Kurven dar; es sind lediglich Verbindungslinien, um die zytostatischen Effekte stärker hervortreten zu lassen.

II. Retikulosarkome

Fall 9: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I. Dieses Zytostatikum hatte bei Vergleich der Nukleinsäureindices nur einen fraglichen Effekt auf die RNS- Synthese. Die Senkung betrug nur 19%' und fällt damit in die Fehlerbreite der Methode.

Es konnte nur eine geringe Verminderung des Markierungsindex festgestellt werden. Die Markierungsintensität blieb unverändert.

Epikrise: Der Lymphknoten der 42- jährigen Patientin mit Retikulosarkom zeigte keine meßbare Sensibilität gegenüber Ibenzmethyzin. Therapeutisch wurden zunächst das Mediastinum und die Zervikalregion mit 3ooo R bestrahlt. Danach trat eine kurze Besserung ein. Ein erneuter Therapieversuch mit insgesamt 2,5 g Cyklophosphamid bewirkte keine Remission. Auch ein weiterer Versuch mit insgesamt 8oo mg Natulan als Infusion blieb erfolglos, was mit dem in- vitro- Test übereinstimmt.

Fall 1o: Untersucht wurden: Ibenzmethyzin Dosis II, Sinalost Dosis II, Actinomycin Dosis II, Vinblastin Dosis II, Prednisolom Dosis IV.

Hier wurde der H^3- Thymidineinbau in die Sarkomzellen durch alle oben genannten Zytostatika, außer Vinblastin, hemmend beeinflußt.

Dabei wirkten Decortin H Dosis IV mit 43% iger Senkung und Sinalost II mit 4o% iger Senkung am

stärksten. Bei den anderen Substanzen schwankte die Reduktion um 27%. Die RNS- Synthese wurde durch Actinomycin und Prednisolon äußerst stark vermindert. Die Hemmung betrug für Actinomycin 81%, für Prednisolon 78%. Ibenzmethyzin, Stickstofflost und Vinblastin zeigten keinen Effekt.

Epikrise: Der retikulosarkomatöse Lymphknoten der 58- jährigen Patientin erwies sich als äußerst empfindlich gegen Actinomycin und Prednisolon in hoher Dosierung. Diese positiven Testergebnisse konnten in vivo nicht verglichen werden, da der Konglomerattumor wegen geeigneter Lokalisation bestrahlt wurde.

Fall 11: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I und II; Sinalost Dosis I und II; Actinomycin Dosis I und II und Vinblastin Dosis I und II.

Ibenzmethyzin Dosis II verminderte die H^3-Thymidin- Einbaurate um 32%. Dabei wurde der Markierungsindex und die Markierungsintensität der großen basophilen Sarkomzellen gesenkt. Die übrigen getesteten zytostatischen Medikamente erwiesen sich als nicht wirkungsvoll auf die DNS-Synthese. Sinalost hatte eher einen leicht stimulierenden Effekt. Die RNS- SYnthese wurde nur durch Actinomycin mit 55% deutlich gesenkt.Auch hier wurde wieder besonders die große basophile Sarkomzelle betroffen.

Epikrise: Der Lymphknoten eines 65- jährigen Patienten mit ausgedehnter, generalisierter Sar-

komatose war mäßig gegen Ibenzmethyzin und mittelstark gegen Actinomycin C empfindlich. Nach den in-vitro- Ergebnissen wurde bei diesem Patienten eine Behandlung mit Ibenzmethyzin versucht, zunächst mit 15o mg, später mit 3oo mg täglich, bis zu einer Gesamtdosis von 1o,o g. Die Lymphknoten wurden zwar weicher und kleiner, Hautinfiltrate nahmen ab, jedoch traten schon in der 4. Behandlungswoche erneut Lymphome auf. Außerdem kam es zu einem ausgedehnten Lymphödem nach Vergrößerung der Leistenlymphknoten. Daraufhin wurden zusätzlich 2oo gamma Actinomycin C täglich intravenös appliziert. Gleichzeitig erhielt der Patient jedoch noch Saluretika, Herz- und Kreislaufmittel. Nach 1o Tagen war zwar das Lymphödem abgeklungen, die riesigen Lymphknotenpakete zeigten aber nur eine minimale Rückbildungstendenz.

Da sowohl Natulan als auch Actinomycin nicht den erwarteten Erfolg hatten, wie man sich diesen aus den in-vitro- Ergebnissen erhofft hatte, wurde das Stickstofflostderivat Cyclophosphamid versucht. Bereits nach der ersten in Form der Stoßtherapie applizierten Endoxandosis (1,5 g) kam es zu einer erheblichen Rückbildung der tastbaren Lymphome und Hautinfiltrationen.

Fall 12: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II, Sinalost Dosis II und Decortin Dosis II. Ibenzmethyzin bewirkte eine 52% ige Senkung der DNS- Synthese und eine 44% ige Reduzierung der RNS- Synthese. Sinalost hatte einen markanten Effekt: es reduzierte die DNS- um 81% und die

RNS- Synthese um 7o%. Die DNS- Hemmung wurde durch die Senkung von Markierungsindex und Markierungsintensität hervorgerufen, während die RNS- Hemmung nur durch eine Senkung des Markierungsindex bewirkt wurde.

Dabei wurde die basophile Sarkomzelle von allen Zelltypen am deutlichsten im Nukleinsäureaufbau gestört.

Abb. 7: Wirkung von N-Lost, Jbenzmethyzin und Decortin auf die DNS- und RNS- Synthese des Lymphknotens bei einem Retikulosarkom (Fall 12): insbesondere fällt die fast völlige Aufhebung der Nukleinsäuresynthese unter Stickstofflost auf.

Epikrise: Dieser Lymphknoten eines 72- jährigen Patienten mit fortgeschrittenem, nur mit Cortison behandeltem Retikulosarkom reagierte insbesondere auf Stickstofflost hochempfindlich. Da der Prozeß bereits sehr fortgeschritten war, wurde auf eine Strahlentherapie verzichtet und ein Therapieversuch entsprechend dem in-vitro-Ergebnis mit einem Lostderivat unternommen.Statt Sinalost wurde das weniger toxische N-Lost-Derivat Endoxan (Cyclophosphamid) in hoher Dosierung verwendet. Insgesamt erhielt der Patient im Abstand von 1o Tagen 4 Endoxanstöße zu je 14oo mg intravenös. Bereits nach einer Woche begannen die Lymphome weicher und kleiner zu werden. Nach 56oo mg Endoxan war eine gute Remission der sarkomatösen Lymphome und eine Normalisierung der BKS von 4o/7o auf 4/7 mm eingetreten. Somit stimmte das in-vitro-Ergebnis mit dem in-vivo-Erfolg gut überein.

Fall 13: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II, Sinalost Dosis II und Actinomycin Dosis II.
Mit Ibenzmethyzin wurde eine mäßige Hemmwirkung auf die DNS- Synthese erzielt (32%). Die RNS-Synthese wurde mit 25% noch geringer beeinflußt, und die Proteinsynthese zeigte mit 18% nur einen fraglichen Effekt.
Sinalost hatte weder auf den Nukleosid- noch auf den Aminosäureeinbau eine Wirkung.
Actinomycin entfaltete mit 48% iger Hemmung im RNS- Stoffwechsel und mit 37% iger Reduzierung im Aminosäureeinbau die beste Wirkung.

Auch in diesem Fall wurde der Nukleosideinbau besonders in die großen basophilen Sarkomzellen deutlich vermindert (s. Abb. 8).

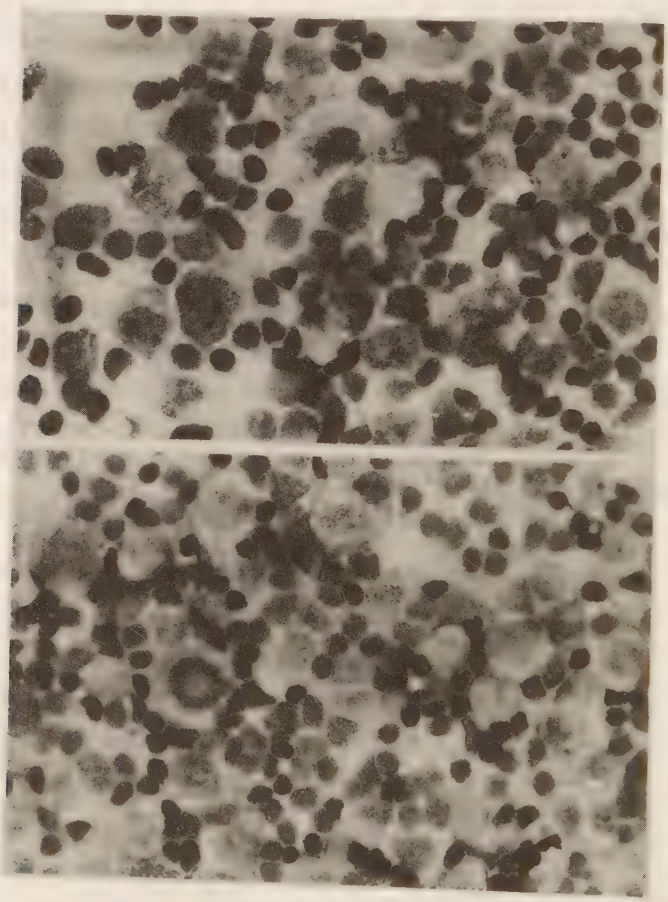


Abb. 8: H^3- Uridineinbau, besonders in die Sarkomzellen, ohne Zytostatikum (oben) und nach Actinomycin C Dosis II (unten).

Epikrise:Der Lymphknoten des 41- jährigen Patienten mit Retikulosarkom reagierte gering auf Ibenzmethyzin und gut auf Actinomycin. Klinisch konnte durch Actinomycin eine vorübergehende Remission erzielt werden, während Natulan und Endoxan wirkungslos blieben.

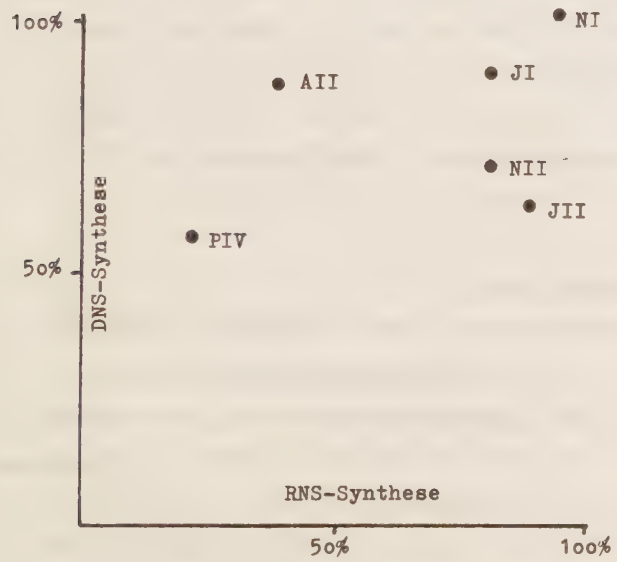


Abb. 9: Durchschnittlicher Effekt verschiedener Zytostatika (A = Actinomycin , J = Ibenzmethyzin, N = Stickstofflost, P = Prednisolon) auf die DNS- und RNS- Synthese aller untersuchten Retikulosarkome.

Zusammenfassend kann gesagt werden: auch das sarkomatöse Gewebe ließ sich durch Zytostatika in seinem Nukleinsäurestoffwechsel mehr oder weniger beeinflussen. Dabei hatte Ibenzmethyzin in 4 von 5 untersuchten Fällen einen Effekt auf die DNS-, in einem Fall auf die RNS- Synthese, Sinalost in 2 von 4 Fällen auf die DNS- und auch in einem Fall auf die RNS- Synthese. Actinomycin hemmte in allen 3 untersuchten Fällen den H^3- Uridineinbau, während der Aminosäureeinbau nur in einem Fall gehemmt wurde. Vinblastin blieb bei dem getesteten Sarkomfall wirkungslos. Prednisolon hatte nur in Dosis IV einen deutlichen Effekt.

III. Lymphadenosen

Fall 14: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II, Sinalost Dosis II, Actinomycin Dosis II.
Durch Ibenzmethyzin wurde die DNS- Synthese um 54% stark und die RNS- Synthese um 24% geringgradig gesenkt. Dabei wurde die Silberkornzahl wesentlich stärker beeinflußt als der Prozentsatz der synthetisierenden Zellen (Markierungsindex). Stickstofflost bewirkte keine nachweisbaren Veränderungen. Actinomycin hatte wiederum auf die RNS- Synthese mit 67% eine gute Hemmwirkung, wobei der Markierungsindex deutlicher vermindert war als die Markierungsintensität.
Epikrise: Der Lymphknoten des 63- jährigen Patienten mit reifzelliger Lymphadenose zeigte

eine gute Ibenzmethyzin- und eine ausgezeichnete Actinomycinempfindlichkeit. Da keine wesentlichen Beschwerden auftraten, wurde bisher von einer zytostatischen Therapie abgesehen.

Fall 15: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis II, Sinalost Dosis II, Prednisolon Dosis I und II.
Die DNS- Synthese wurde durch keines der Medikamente beeinflußt, während die RNS- Synthese eine fragliche Hemmung durch Stickstofflost erkennen ließ.
Epikrise: Der Lymphknoten eines 57- jährigen Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie wurde in seiner für das chronische Krankheitsbild typischen niedrigen DNS- Synthese durch die geprüften Zytostatika nicht weiter reduziert.

Fall 16: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I und II, Sinalost Dosis I und II, Prednisolon Dosis II und IV.
Ibenzmethyzin Dosis I, Sinalost Dosis I und II und Decortin Dosis II beeinflußten die DNS- Synthese nicht. Unter Natulan Dosis II erfolgte eine Reduktion des H^3- Thymidineinbaus auf 55% des Kontrollwertes. Unter Prednisolon Dosis IV ergab sich eine Senkung der DNS- Synthese um 87%. Dabei war besonders die Verminderung der Markierungsintensität, gemessen an der Abnahme der Silberkörner über den markierten Zellen,

um durchschnittlich 5o% auffällig.

Epikrise: Die DNS- Synthese dieses Lymphknotens eines 62- jährigen Patienten mit chronischer Lymphadenose wurde durch therapeutische Dosen von Zytostatika nicht beeinflußt. Nur höhere Konzentrationen von Ibenzmethyzin und eine Extremdosis von Prednisolon (Dosis IV) zeigten einen Effekt.

Fall 17: Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I, Sinalost Dosis I, Prednisolon Dosis I und II.
Eine deutliche Depression der DNS- Synthese wurde nur durch Natulan bewirkt, wobei der Hauptangriffspunkt der Wirkung in den lymphatischen Retikulumzellen lag. Die Senkung, gemessen am Nukleinsäureindex des gesamten Lymphknotengewebes, betrug 52%. Die RNS- Synthese wurde nicht beeinflußt. Sinalost und Decortin bewirkten keine sichere Reduktion.
Epikrise: Bei dieser mit niedrigen Dosen von Endoxan vorbehandelten atypischen Lymphadenose eines 71- jährigen Patienten kam es nur unter Natulan in therapeutisch entsprechender Dosierung zu einer DNS- Synthesehemmung. (Abb. 1o)

Faßt man die Lymphadenosen zusammen, so muß festgestellt werden, daß sie in vitro weniger gut auf Zytostatika ansprachen. Ibenzmethyzin senkte die DNS- Synthese in 3 von 4 Fällen, die RNS- Synthese nur einmal. Sinalost erwies sich als unwirksam, Actinomycin hemmte die RNS- Synthese in einem Fall. Prednisolon hatte nur einmal bei 1ooo-facher Normaldosis einen depressiven Effekt auf die DNS.

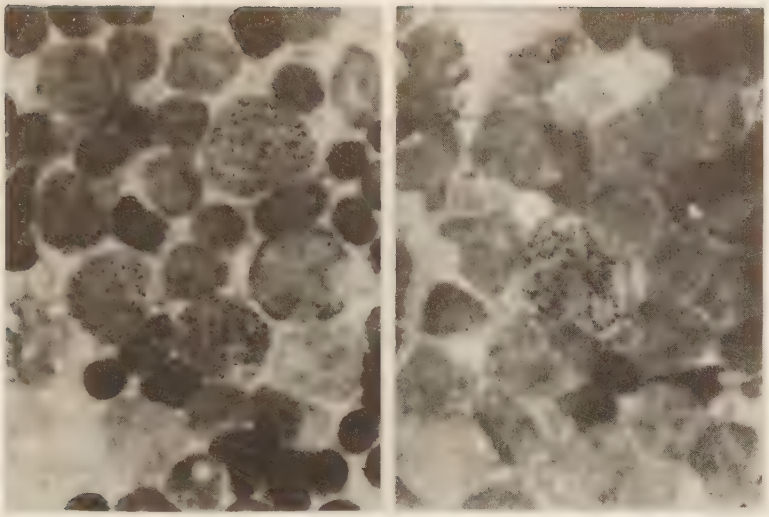


Abb. 1o: H^3- Thymidineinbau in Lymphknotenzellen einer Lymphadenose ohne Zytostatikum (links) und nach Einwirkung von Natulan DosisII (rechts).

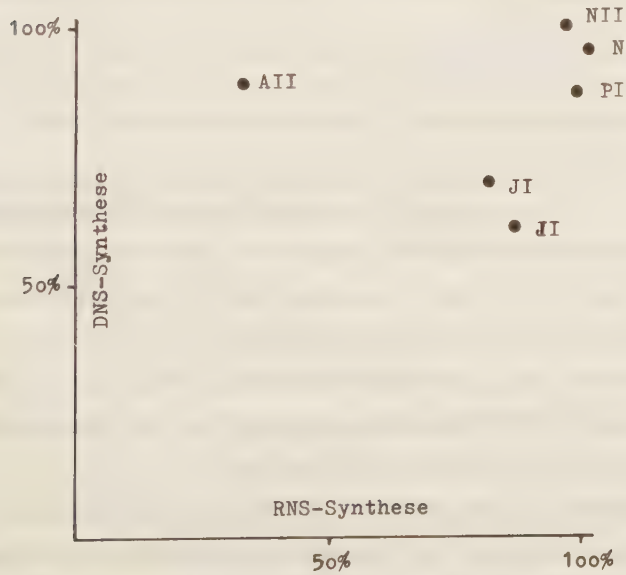


Abb. 11: Durchschnittlicher Effekt von Ibenzmethyzin (=J), Sinalost (=N), Actinomycin (=A) und Prednisolon (=P) auf die DNS- und RNS- Synthese der Lymphadenosen.

IV. Hyperplasien

Untersucht wurden 9 Lymphknoten von Patienten mit reaktiver Hyperplasie (Fälle 18-26). Im folgenden werden die Fälle nicht einzeln abgehandelt, da sich bei der Auswertung keine wesentlichen Unterschiede herausstellten.

Untersucht wurden Ibenzmethyzin Dosis I und II, Sinalost Dosis I und II, Actinomycin Dosis II, Vinblastin Dosis I und II, und Prednisolon Dosis II und IV.

Keines der verwendeten Zytostatika hatte einen bedeutenden Effekt auf die DNS- Synthese. Die Werte lagen alle innerhalb der 2o% igen Fehlergrenze. Auch die RNS- Synthese wurde nur sehr schwach beeinflußt. In 2 Fällen senkte Ibenzmethyzin den Uridineinbau um 31% bzw. 26%. Die Proteinsynthese wurde in einem Fall durch Ibenzmethyzin um 3o% und durch Vinblastin um 28% gesenkt. Prednisolon hatte in einem Fall in extrem hoher Dosierung (Dosis IV) mit 57% Senkung des H^3- Thymidineinbaus einen deutlichen Hemmeffekt auf die DNS- Synthese.

Bei allen Hyperplasien wurde die lymphatische Retikulumzelle noch am besten beeinflußt, wobei hauptsächlich der Markierungsindex vermindert wurde. Die Markierungsintensität blieb weitgehend konstant.

Abb. 12 zeigt für alle9 Hyperplasien die durchschnittliche DNS-/RNS- Synthesekorrelation und läßt das geringe Ansprechen auf Zytostatika erkennen.

Nach diesen Ergebnissen verhält sich die Lymphknotenhyperplasie gegenüber zytostatischen Substanzen im Durchschnitt weitgehend resistent.

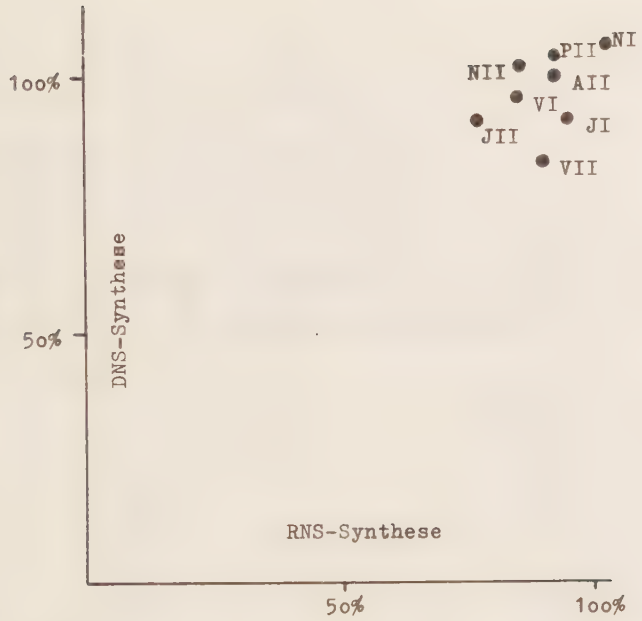


Abb.12. Durchschnittlicher Effekt verschiedener Zytostatika auf die Nukleinsäuresynthese der Lymphknoten bei reaktiver Hyperplasie. (Bezeichnungen s.Abb.4).

V. Zytostatische Beeinflussung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese aller maligner Lymphome.

Die Befunde der 26 auswertbaren Fälle sind in Tabelle I zusammenfassend wiedergegeben. Sie zeigt die Änderung des Nukleinsäureindex in Prozent vom Kontrollwert. Läßt man nur eine Synthesehemmung um mehr als 2o% des Ausgangswertes als echten zytostatischen Effekt gelten, so wurde bei den 17 untersuchten malignen Lymphomen (8 Lymphogranulomatosen, 5 Retikulosarkome, 4 Lymphadenosen) insgesamt 12 mal, das sind 7o%, die DNS-Synthese von einem oder mehreren Zytostatika gesenkt.

Tabelle I Zytostatikaeffekte nach 1-stündiger Zytostatikaeinwirkung auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese aller untersuchter Lymphome. Die Zahlen geben die zytostatische Beeinflussung der DNS-Synthese (1.Zahl), RNS-Synthese (2.Zahl) und Proteinsynthese (3. Zahl) in Prozent des Kontrollwertes an (Kontrollwert = 1oo%). J = Ibenzmethyzin, N = Stickstoff-Lost, P = Prednisolon, A = Actinomycin, V = Vinblastin I = Normalkonzentration, II = 1o-fache Normaldosis.

Fall	J I	J II	N I	N II	I/II	P IV	A I	A II	V I	V II
Lymphogranulomatosen										
1	87 76 ø		88 88 ø		1o4 1o7 ø					
2	34 94 ø		94 1o6 ø		99 1o5 ø					
3		51 8o ø		1o4 86 ø	112 1o2 ø		96 95 ø	91 68 ø	11o 96 ø	113 99 ø
4	34 ø ø	3o 92 ø	6o ø ø	64 11o ø			ø 97 ø	82 73 ø		92 92 ø
5		38 5o 86		1o5 98 1o2						
6		4o 4o 1o9		119 71 9o						
7	91 91 7o	41 83 83	56 86 1o4	57 92 82				99 49 74		
8	93 45 7o		1o3 82 5o							
Retikulosarkome										
9	98 81 94									
1o		72 1o7 ø		6o 89 ø		57 22 ø		72 19 ø		76 ø ø
11	82 99 ø	68 1o6 ø	112 1o2 ø	1o5 113 ø			99 89 ø	98 45 ø	96 97 ø	98 95 ø
12		48 66 ø		11 3o ø	98 1o4 ø					98 ø ø
13		68 75 82		1o9 9o 9o				94 52 63		
Lymphadenosen										
14		46 76 ø		91 1o6 ø				9o 33 ø		
15		81 1o1 ø		98 83 ø	11o 1o2 ø					
16	92 ø ø	55 11o ø	111 1o9 ø	112 1o9 ø	93 99 ø	13 9o ø				
17	48 82 ø		89 1o2 ø		1o6 1o9 ø					
Hyperplasien										
18		1o2 92 ø								
19	83 1o3 ø	82 74 ø	1o5 1o5 ø	1o6 86 ø						
2o						13 9o ø				
21		99 ø ø		1o1 ø ø	1o4 97 ø				83 93 ø	85 92 ø
22	112 91 ø	82 69 ø	113 1o1 ø	88 88 ø	98 93 ø			1o4 ø ø		1o5 ø ø
23										
24										
25	ø ø 7o									ø 94 ø
26	82 93 84									

Die RNS- Synthese wurde insgesamt in 11 von 17 Fällen durch mindestens 1 Zytostatikum gesenkt. Dabei war der Actinomycinanteil mit 64% am größten.
Die Proteinsynthese wurde am geringsten beeinflußt.
In Abb. 13 wurde die mittlere RNS-/Proteinsynthesekorrelation für alle Fälle aufgezeichnet, bei denen wir die RNS- und die Proteinsynthese untersuchten.

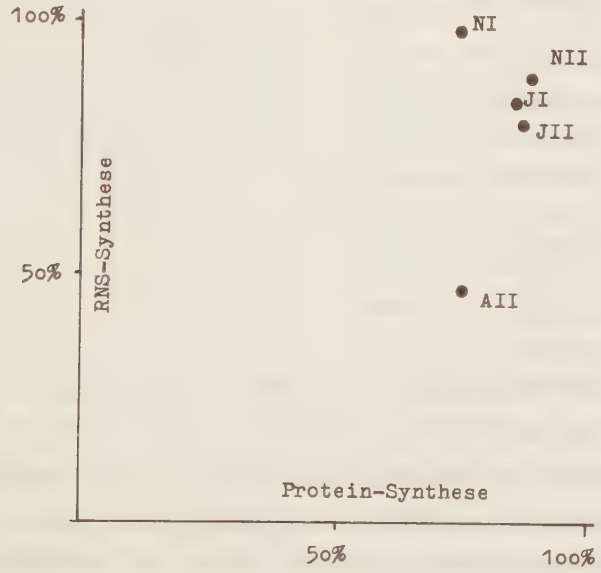


Abb. 13: RNS-/Proteinsynthesekorrelation aller untersuchter Fälle.

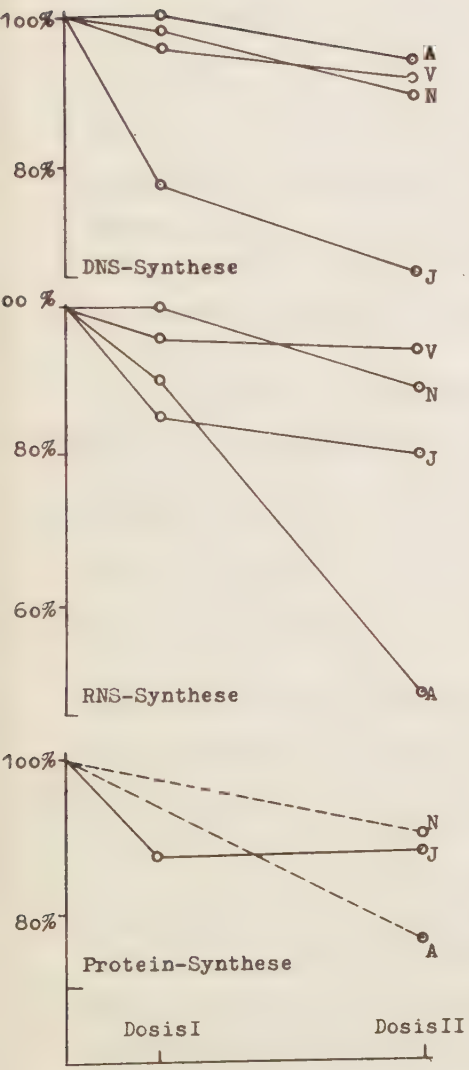
Eine mögliche lineare Beziehung ließ sich nur angedeutet feststellen, da nur 6 von den 17 malignen Lymphomen zur Verfügung standen. Davon wurden 2 durch Ibenzmethyzin, Stickstofflost und Actinomycin meßbar beeinflußt.

Für die einzelnen Zytostatika ergeben sich folgende Verhältnisse:

Zytostatikum	DNS-Synthese untersucht	Hemmeffekt	RNS-Synthese untersucht	Hemmeffekt
Ibenzmethyzin				
Dosis I	9	3	7	2
DosisII	12	11	12	6
Stickstofflost				
Dosis I	8	3	6	ø
DosisII	12	4	12	2
Actinomycim C				
Dosis I	2	ø	3	ø
Dosis II	7	1	7	7
Vinblastin				
Dosis I	2	ø	3	ø
DosisII	4	1	3	ø
Prednisolon				
DosisII	6	ø	6	ø
DosisIV	2	2	2	1

Vergleicht man die Fälle, bei denen ein Zytostatikum in einfacher und in zehnfacher Konzentration verwendet wurde, so ergibt sich in manchen Fällen eine konstante Abhängigkeit der Wirksamkeit von der Konzentration.

Besonders Ibenzmethyzin und Actinomycin, aber auch Sinalost zeigten mit steigender Konzentration eine stärkere Hemmwirkung. Das ist in Abb. 14 getrennt für die DNS-, RNS- und Proteinsynthese dargestellt: Die höheren Dosen wirkten im allgemeinen sicherer; Ibenzmethyzin und Stickstofflost hatten jedoch auch in niedriger Dosierung



vor allem bei der Lymphogranulomatose einen beachtlichen reduzierenden Effekt.

Eine konstant nachweisbare Beziehung zwischen der Stärke der Nukleinsäuresynthese und der Beeinflußbarkeit durch die getesteten Zytostatika war nicht mit Sicherheit nachzuweisen. Zwar konnte beobachtet werden, daß stärker DNS- und RNS- synthetisierende Lymphknoten in den meisten Fällen durch Zytostatika in ihrer Synthesetätigkeit erheblich gestört wurden, jedoch gab es auch Fälle mit geringer oder langsamer Nukleinsäuresynthese, die hemmend beeinflußt wurden.

Abb. 14: Abhängigkeit der Wirkung verschiedener Zytostatika auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese von ihrer Konzentration. (Bezeichnungen s. Abb.4.) .

VI. Zusammenfassender Vergleich der gemeinsamen in-vitro und in-vivo-Fälle.

Von 17 malignen Lymphomen konnte in 8 Fällen 14 mal ein Vergleich mit späteren klinischen Wirkungen angestellt werden. Von den restlichen 9 Fällen wurden die 4 Lymphadenosen überhaupt nicht zytostatisch behandelt, da sie klinisch keine Beschwerden machten, und die übrigen 5 wegen geeigneter Lokalisation der Strahlentherapie zugeführt.

Bei 4 Lymphogranulomatosen bewirkte Natulan in vitro eine Synthesehemmung und klinisch eine mehr oder weniger langdauernde Remission. Stickstofflost hatte bei einer Lymphogranulomatose sowohl in vitro als auch in vivo keinen Effekt. Bei einem anderen Lymphogranulomatosefall hatte es in vitro keine meßbare Wirkung; klinisch jedoch sprachen die Lymphome auf das besser verträgliche Stickstofflostderivat Cyclophosphamid (Endoxan) an, welches nur in vivo wahrscheinlich durch eine enzymatische Spaltung in der Leber seine zytostatische Wirkung entfaltet(17). Dabei soll als wirksame Substanz Stickstofflost vom Cyclophosphamid abgespalten werden (32, 7o).

Von 5 Retikulosarkomfällen konnten 4 Testergebnisse mit den therapeutischen Ergebnissen verglichen werden: in 1 Fall hatte Ibenzmethyzin in vitro und in vivo keine intensive Wirkung. In 2 weiteren Fällen hatte es in vitro einmal einen deutlichen Effekt, bewirkte jedoch in vivo nur eine Teilremission, und einmal eine mäßige Hemmwirkung, zeigte aber in vivo keinen Erfolg.

Stickstofflost wirkte einmal weder in vitro noch in vivo, in einem anderen Fall stimmte die sehr gute Hemmwirkung in vitro auch mit einem markanten therapeutischen Erfolg überein. In einem weiteren Fall fand keine Übereinstimmung statt: keine Wirkung in vitro, guter Effekt in vivo.

Actinomycin hatte einmal eine gute Übereinstimmung der in vitro und der in vivo Ergebnisse, ein anderes mal stand ein gutes Testergebnis einem erfolglosen Therapieversuch gegenüber.

Von den insgesamt 14 vergleichbaren Fällen zeigten 9 eine gute, 3 eine fragliche und 2 keine Übereinstimmung.

In Tabelle II werden die experimentellen und klinischen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

Tabelle II Vergleich der in vitro- und in vivo-Wirkung der untersuchten Zytostatika.

	Fall	Zytostatikum in vitro/in vivo	Hemmung der DNS/RNS-Synthese in vitro (in % des Kontrollwertes		Wirkung in vivo	
Lymphogranulomatosen	4	Ibenzmethyzin I/ Ibenzmethyzin	3o/92	+	Remission	+
	5	Ibenz.II/Ibenz.	38/5o	+	Remission	+
		Sinalost/Endoxan	1o5/98	ø	keine	ø
	6	Ibenz.II/Ibenz.	4o/51	+	Remission	+
		Sinalost/Endoxan	119/71	-+	Remission	+
	7	Ibenz.II/Ibenz.	41/83	+	Remission	+
	9	Ibenz.II/Ibenz.	98/81	ø	keine	ø
Retikulosarkome	11	IbenzII/Ibenz.	68/1o6	+-	Teil-Remission	+-
		Sinalost/Endoxan	1o5/113	ø	Remission	+
		Actinomycin/ Sanamycin	1o2/45	-+	keine	ø
	12	Sinalost/Endoxan	11/3o	+	Remission	+
	13	Ibenz.II/Ibenz.	62/83	+-	Keine	ø
		Sinalost/Endoxan	1o3/97	-	keine	ø
		Actinomycin/ Sanamycin	1o3/52	-+	Remission	+

D. Diskussion

I. Fehlermöglichkeiten der Methode.

Die 1-stündige Kurzzeitkultur wurde aus folgenden Gründen gewählt: 1. kommt sie den Verhältnissen in vivo sicher am nächsten, und 2. konnten auf diese Weise bereits in relativ kurzer Zeit meßbare Zytostatikaeffekte erzielt werden.

Durch einige Versuche, bei denen neben der üblichen 1- stündigen Inkubation auch eine 3- stündige durchgeführt wurde, ließ sich zeigen, daß der Einbau von H^3-Nukleosiden nur gering gesteigert wurde, wie auch RUBINI (88) beschrieb. Mit der Kurzinkubation wurden die DNS- Synthese, die RNS- Synthese, die weniger phasengebunden ist und nur in der kurzen Mitosephase unterbrochen wird (59), und die Proteinsynthese erfaßt. Die Mitosephase und die postmitotische Ruhephase können nur in vivo oder in Langzeitkulturen untersucht werden.

Bei den Untersuchungen kam es darauf an, daß die Gewebspartikel für die Zeit der Inkubation vital blieben. Eine weitere Voraussetzung war eine optimale Diffusion des verwendeten Materials, damit sowohl die radioaktiv markierten Vorläufer als auch die zytostatischen Substanzen in ausreichender Menge wirken konnten.

Diese Vorbedingungen schienen durch die Versuchsanordnung gegeben,denn die Gewebspartikel waren mit ca.$1mm^3$ klein genug, um einerseits den Gewebsverband zu erhalten und um andererseits ausreichend vom Kulturmedium diffun-

diert zu werden. Autoradiographische Untersuchungen hatten gezeigt, daß so die Markierung mit radioaktiven Stoffen in einer 1oo µ breiten Randzone praktisch konstant ist (76). Weiterhin war es unbedingt notwendig, daß diejenigen Zellen, die sich in vivo in der Nukleinsäuresynthesephase befanden, auch in vitro die Synthese fortsetzten (6, 76).

Bei der Durchführung der Versuche gab es in jedem Arbeitsgang mögliche Fehlerquellen, die jedoch durch genaues Einhalten der Versuchsvorschriften und sorgfältiges Arbeiten weitgehend vermieden werden konnten:

1. Exstirpation und Inkubation.

Der Zeitabstand zwischen Exstirpation und Inkubation muß möglichst klein gehalten werden und bei allen Untersuchungen konstant sein. Die Exstirpation soll schnell erfolgen, um die Vitalität und die damit verbundene Synthesetätigkeit nicht zu vermindern. Die Medienzusammensetzung muß immer die gleiche sein, stärkere pH- Schwankungen stören den Einbau markierter Bausteine in die Zellen. Die tritiummarkierten Bausteine könnten bereits durch Strahlung eine gewisse Hemmwirkung auf die Vitalität der Zellen ausüben. Das erscheint jedoch in der hier angegebenen Versuchsanordnung unerheblich zu sein, da die verwendeten H^3- Nukleoside und die H^3- Aminosäure nur eine geringe Strahlungsenergie besitzen. Strahlenschäden durch Tritium sind nach einer Stunde noch nicht beobachtet worden (26, 56).

2. Anfertigung der Tupf- und Ausstrichpräparate.
Es dürfen nur die oberflächlichen Zellschichten ausgestrichen werden, da nur diese gute Diffusionsbedingungen besitzen (76). Tiefer liegende Zellen sind weniger gut markiert.

3. Autoradiographisches Filmverfahren.
Hierbei können neben einer echten durch die beta-Strahlung des Tritiums hervorgerufenen Schwärzung auch Fehlschwärzungen (sog. Nulleffekt) vorkommen. Diese können entstehen:

a) durch Wechselwirkungen zwischen Präparat und Emulsionsschicht des Films, z.B. durch chemische Substanzen. BOYD et al (15) konnten zeigen, daß durch direkten Kontakt von unmarkierten Zellen mit der Filmemulsion artifizielle Schwärzungen entstehen. Inaktive Knochenmarkausstriche ergaben auf autoradiographischen Filmplatten Schwärzungen an Stellen starker Zellanhäufung.
Auch Druckstellen, die durch längeres Lagern oder durch Bearbeiten der Platten in der Dunkelkammer entstehen, können Artefakte bewirken. So entstehen beim Abstreifen der Stripping-Filme von der Glasunterlage leicht elektrische Ladungen, die als helle Funken in der Dunkelkammer zu sehen sind und einen Nulleffekt hervorrufen.

b) durch Fremdeinwirkung: radioaktive Einschlüsse in den verwendeten Glasplatten oder in der Emulsionsschicht, Streustrahlungen aus der Umgebung.

c) durch Lichteinwirkung bei nicht optimaler Dunkelkammer.

d) durch spontane Entladungen elektrisch geladener Kleidungsstücke und Instrumente.

e) durch uneinheitliches Entwickeln und Fixieren.

4. Expositionszeit.

Am günstigsten erscheint eine Expositionszeit von 14 Tagen (88), denn mit zunehmender Verlängerung nimmt der Nulleffekt immer mehr zu (15).

5. Färbung der fertigen Autoradiographien.

Die für die Zytologie charakteristische Giemsafärbung kann durch den Strippingfilm so verändert werden, daß bestimmte Differenzierungszeichen der einzelnen Zelltypen verwischt werden und dadurch die Zuordnung der verschiedenen markierten Zellen zu den einzelnen Zelltypen schwierig wird.

6. Auswertung.

Bei Präparaten mit starker H^3-Nukleosideinbaurate sind manche Zellen so stark markiert, daß sie nicht mit Sicherheit identifiziert werden können. Es ist dann besonders schwierig, lymphatische Retikulumzellen, Plasmoblasten und basophile Rundzellen sicher voneinander zu unterscheiden.

II. Wirkungsmechanismus der Zytostatika.

Die Effekte der zytostatischen Substanzen in der lebenden Zelle sind sehr vielfältig, da sie mit den verschiedensten Zellbausteinen reagieren können (46). Über den Wirkungsmechanismus der hier verwendeten Zytostatika ist im wesentlichen folgendes bekannt:

1. Ibenzmethyzin, das Methylhydrazinderivat Natulan, übt eine Wirkung auf die DNS aus. Das konnte durch verschie-

dene Untersuchungen festgestellt werden (33,9o.1o2). Es ließen sich ein Absinken der Mitoserate und Veränderungen an den Chromosomen wie Chromosomenbrüche und Translokationen beobachten, aus denen sich Teilungs- und Wachstumsstörungen ergeben dürften. Damit verknüpft wäre ein Angriff an der DNS, da sie Hauptbestandteil der Chromosomen ist.

Physiko-chemische Untersuchungen haben ergeben, daß Ibenzmethyzin auf die DNS in vitro wirkt, wobei Wasserstoffperoxyd entsteht, das für einen Eingriff in die DNS verantwortlich zu machen ist (11,12).

Auch ein Wirkungsmechanismus durch Alkylierung von Desoxyribonukleinsäure muß in Erwägung gezogen werden (1o2).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß Natulan den Einbau von markierten Nukleosiden (C^{14}-Glycin, H^3-Thymidin) in die DNS vermindert (33).

Damit nimmt Ibenzmethyzin als tumorhemmende Verbindungsklasse der Methylhydrazine eine Sonderstellung ein: Es kann im Zellstoffwechsel zugleich oxydierend und alkylierend wirken (1o2).

2. Sinalost (Stickstofflost).

Diese Substanz ist ein typischer Vertreter der alkylierenden Verbindungen. Der Wirkungsmechanismus ist sehr vielseitig. Eine wesentliche Rolle spielen bei ihrer Wirkung auf die Zelle mit nachfolgendem Zelltod nach HARBERS Wechselwirkungen mit der DNS (46).

AUERBACH et al (5) wiesen nach, daß Stickstofflost chro-

mosomale Veränderungen bewirkt und damit mutagene Eigenschaften besitzt.

Nach LAWLEY (63,64) ist für Stickstofflost der empfindlichste Angriffspunkt das N-7-Atom im Guanin. Dieses wird alkyliert, die DNS-Stränge der Doppelhelix vernetzen miteinander, und das Molekül bricht auseinander.

Auch die RNS soll auf ähnliche Weise angegriffen werden (34).

Der Einbau markierter Vorstufen, z.B. P^{32} in die DNS und RNS wird nur gering gehemmt (25).

3. Actinomycin C

Hierbei handelt es sich um ein Antibiotikum mit zytostatischem Effekt (43). Erste Hinweise für den Wirkungsmechanismus ergaben sich durch die Beobachtung, daß der Hemmeffekt des Actinomycins auf Mikroorganismen durch DNS-Gabe aufgehoben werden kann (58). Das soll auf einer Komplexbildung des Actinomycins mit der DNS beruhen (85,74).

HARBERS et al (47) wiesen die Bindung an die DNS mit Hilfe von radioaktivmarkiertem Actinomycin nach.

4. Vinblastin.

Dieses Medikament zählt wie das Kolchizin zu den typischen Mitosegiften, die in der Metaphase der Zellteilung einen absoluten Mitosestopp bewirken (14,19). Dabei kommt es in der Regel zu pathologischen Chromosomenveränderungen (24).

Vinblastin scheint keinen Einfluß auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese zu haben, wie das JOHNSON et al (54) durch in-vitro-Versuche mit Aszites-Tumorzellen, die mit

C^{14}-Format und C^{14}-Glycin inkubiert wurden (Vinblastin-dosis bis zu 1oo gamma/ml Kulturmedium), gezeigt haben.

Abweichend davon berichten BICKIS et al (13) von Senkungen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese bei in vitro inkubierten menschlichem Tumorgewebe, allerdings durch 2oo bis 3oo-fache der in vivo verwendeten Vinblastin-Dosis.

In anderen Phasen des Zellzyklus zeigt sich auch in hohen Konzentrationen kein Effekt (19).

5. Prednisolon.

Dieses Glukokortikoid besitzt einen lymphotoxischen Effekt (27). GRUNDMANN (41) konnte zeigen, daß Cortison dosisabhängig eine Verminderung des lymphatischen Gewebes bewirkt. KIT (6o) demonstrierte an tierischem lymphatischen Gewebe, daß der Einbau von C^{14}-Aminosäuren gehemmt wird.

Zusammenfassend kann danach gesagt werden, daß der Hauptangriffspunkt der Zytostatika im Nukleinsäurestoffwechsel liegt (13,84).

III. Theoretische Möglichkeiten für die Hemmung der Zellproliferation durch Zytostatika.

Für eine Beeinflussung des Nukleinsäure-Syntheseablaufes und eine nachfolgende Störung der Zellproliferation durch zytostatische Substanzen sind mehrere Möglichkeiten gegeben:

1. Hemmung der postmitotischen Ruhephase (G1-phase),

die eine Stunde bis mehrere Tage dauert (21,59,61,91) und zur Vorbereitung der DNS- Synthese dient.
Dieser Wirkungsmechanismus kann aus Untersuchungen von PALME und LISS (78) mit dem Stickstofflostderivat Cyclophosphamid an gesunden proliferierenden Geweben der Maus abgeleitet werden. Ein ähnlicher Vorgang scheint für Ibenzmethyzin zu existieren (33).
Auch die ionisierenden Röntgenstrahlen greifen in diese Phase des Zellzyklus ein, wie an regenerierender Rattenleber (1o) und an Leukosezellen des Menschen (61) gezeigt wurde.
2. Hemmung der 5 bis 34 Stunden dauernden DNS- Synthesephase (S-Phase; 21,28,59,61,91,97).
Ein blockierender Einfluß dieser Phase durch Zytostatika ist wiederholt diskutiert worden (33,52,69,78).
Einige Autoren konnten in vitro an Aszites-Tumorzellen der Maus eine Verminderung der DNS-Synthese feststellen (66,89), andere fanden unter Cyclophosphamid entweder keine Veränderungen (79) oder eine Steigerung der DNS-Synthese (8o). PAPAC fand bei Untersuchungen mit H^3-Thymidin, daß der Markierungsindex gegenüber den Kontrollwerten nach Stickstofflost eher vermehrt als vermindert war.Dagegen sank der Mitoseindex ab. Diskutiert wurde, ob der Effekt nicht durch Beeinträchtigung besonders der prämitotischen Ruhephase entstehen könnte. Damit müßte eine primäre Hemmung der DNS- Synthesephase von einer sekundären Hemmung unterschieden werden, die durch eine Störung jeder anderen Phase des Zyklus indirekt hervor-

gerufen werden kann (8o). Hiernach wäre die DNS- Synthese weitgehend stabil gegenüber alkylierenden Zytostatika. Es wurden jedoch auch deutliche Senkungen der DNS-Synthese beobachtet (13). Röntgenstrahlen in hoher Dosierung haben ebenfalls einen direkten Hemmeffekt und wirken so ähnlich wie die alkylierenden Substanzen (46).

3. Hemmung der prämitotischen Ruhephase, die 3o bis 6o Minuten lang dauert und zur unmittelbaren Mitosevorbereitung dient (G_2- Phase).

PAPAC (8o), PALME (79) und ASTALDI (4) konnten zeigen, daß Stickstofflost und Endoxan auf diese Phase hemmend wirken.

4. Hemmung der 4o bis 6o Minuten dauernden Mitosephase (21,28). Dieser Mechanismus gilt, wie bereits oben beschrieben, für Vinblastin und Kolchizin. Ionisierende Strahlen und alkylierende Stoffe scheinen eine in Gang befindliche Zellteilung nicht zu stören (4, 46). Danach müßten Mitoseanomalien nach Zytostatikagabe oder Strahlentherapie Sekundärerscheinungen nach vorausgegangener Phasenschädigung sein.

5. Hemmung der RNS- Synthese.

Entweder wird die RNS-Synthese durch alkylierende Medikamente nicht beeinflußt (69) oder sie reagiert uneinheitlich (Literaturübersicht bei HARBERS, 46).

Nur das Antibiotikum Actinomycin hat einen mehr oder weniger konstant hemmenden Einfluß auf die RNS-Synthese (86).

Die Proteinsynthese läßt sich wahrscheinlich nur schwer beeinflussen. Eine Herabsetzung der Eiweißsynthese verbunden mit einer Verminderung der RNS-Synthese wurde bei Verwendung sehr hoher Dosen von Vinblastin (13) und Ibenzmethyzin (33) erzielt. Andererseits fanden mehrere Autoren auch in extrem hohen Konzentrationen keine wesentliche Abnahme der Proteinsynthese in tierischen oder menschlichen Tumorzellen weder durch Sinalost (66) und Vinblastin (54) noch durch Actinomycin (43).

Alle diese in der Literatur angegebenen Untersuchungen wurden an verschiedenen tierischen physiologischen und pathologischen Geweben durchgeführt, nicht aber am menschlichen lymphatischen Gewebe, welches als besonders zytostatikaempfindlich bekannt ist. Solche Untersuchungen wurden bisher nur vereinzelt vorgenommen (73). Es war daher interessant festzustellen, in wieweit die bisherigen Ergebnisse mit unseren übereinstimmten.

Bei den untersuchten pathologischen Lymphknoten brachten die Auswertungen zum Teil deutliche Reduktionen in der Nukleinsäure- und Proteinsynthese. Dabei übertraf das Ausmaß der DNS-Syntheseverminderung meist das der RNS. Von 25 mit H^3- Thymidin inkubierten Lymphknoten zeigten 15 eine Verminderung der Einbaurate. 1o Lymphome, unter ihnen sämtliche Hyperplasien, reagierten gar nicht oder nur sehr gering. Die Lymphknoten der Lymphogranulomatosefälle wurden am deutlichsten zytostatisch beeinflußt:bei 7 von 8 Lymphknoten dieser Krankheitsgruppe war der Nukleosideinbau vermindert.

Dabei fiel weiter auf, daß die lymphatische Retikulumzelle der Lymphogranulomatosen durch Zytostatika wesentlich stärker hemmend beeinflußt wurde als die lymphatische Retikulumzelle der Hyperplasien. Möglicherweise ist bei dieser verschiedenen Beeinflußbarkeit von Bedeutung, in welchem Reizzustand sich die lymphatische Retikulumzelle befindet (entzündlich? neoplastisch?).
Die Hodgkinzelle zeigte eine ähnliche Reaktion. Ob hier jedoch eine mögliche Verwandtschaft zwischen lymphatischer Retikulumzelle und Hodgkinzelle vorliegt, kann aus diesen Untersuchungen nicht geschlossen werden.
Alle anderen Zellen wurden nicht so stark und konstant betroffen.

Ähnliche Ergebnisse, wenn auch nicht so eindeutig, ergab die Auswertung der mit H^3- Uridin bzw. H^3- Cytidin inkubierten Lymphknoten. Die Proteinsynthese erwies sich gegenüber zytostatischen Medikamenten als sehr stabil: sie wurde am geringsten beeinflußt. Das stimmt auch mit Ergebnissen anderer Autoren überein (13,54,66,).

Die klinischen Erfahrungen zeigen ebenfalls, daß von den lymphoproliferativen Erkrankungen die Lymphogranulomatosen am empfindlichsten auf Zytostatika reagieren. Es folgen die Retikulosarkome und die Lymphadenosen (7,8,51,57,68).

Die geringe zytostatische Beeinflußbarkeit der Hyperplasien erscheint durch die Tatsache begründet, daß Lymphknotenzellen nach Antigenkontakt, der für die wohl meist immunologisch bedingten Lymphknotenhyperplasien

anzunehmen ist, relativ zytostatika- und strahlenresistent sind (93,95,96).

COBB et al konnten an Hand von Gewebekulturen zeigen, daß Gewebe benigner Lymphknoten geringere zytostatische Effekte aufwiesen als Gewebe maligner Lymphome (22). Warum nicht alle Lymphknoten einer Krankheitsgruppe gleich oder ähnlich reagierten, kann nicht erklärt werden. Auch in vivo gibt es Fälle mit gleicher Diagnose, die eine unterschiedliche therapeutische Ansprechbarkeit haben. Das könnte vielleicht an dem jeweiligen Krankheitsstadium und an der Reaktionslage des Organismus liegen. Andererseits gibt es aber auch Fälle, die durch Zytostatika gar nicht zu beeinflussen sind (46).

IV. Vergleich der Effekte der verschiedenen Zytostatika.

Ibenzmethyzin wirkte von allen verwendeten zytostatischen Substanzen am eindrucksvollsten: von 22 mit Natulan untersuchten Lymphknoten zeigten 14, das sind 64%, einen deutlichen Effekt. Auch bei den getesteten Lymphogranulomatosen wirkte dieses Medikament am sichersten.

Das entspricht den klinischen Erfolgen dieses neuen Zytostatikums bei der Lymphogranulomatose. BEGEMANN et al (9) konnten in ihrem Krankengut ca. 8o% Voll- und Teilremissionen erzielen, MATHE et al (72) ca. 7o% und FAIRLEY et al (29) ca. 6o%.

Die Ergebnisse bei den Retikulosarkomen und den Lymphadenosen waren im in-vitro-Test besser als in der Klinik. Die Erfolgsquote liegt hierbei unter 4o% (9,72).

Interessanterweise wurden einige Lymphome durch die viel stärkere Dosis II kaum noch beeinflußt, wenn sie durch Dosis I bereits in ihrer Aktivität gebremst worden waren. Das konnte besonders gut an einem Lymphogranulomatosefall beobachtet werden (s. Dosis-Wirkungskurve Abb.3).

HARBERS (46) beobachtete ein ähnliches Verhalten der Nukleinsäuresynthese nach Röntgenbestrahlung eines Mäusesarkoms. Schon eine niedrige Dosis reduzierte den P^{32}-Einbau in die DNS um etwa 5o%. Eine weitere wesentliche Verringerung fand dann trotz Steigerung der Strahlendosis nicht mehr statt. HARBERS diskutiert aber, daß trotz ausgeschalteter DNS-Synthese ein Einbau bzw. ein endständiger Anbau von DNS-Bausteinen weiter bestehen kann. Auch ADLER (2) und MALKIN (71) beschreiben diese Möglichkeit. Ob das auch für H^3- Thymidin gilt, ist nicht sicher zu sagen. In unseren Ergebnissen fand jedoch häufiger eine weitere Abnahme statt.

Der oben erwähnte Wirkungsmechanismus, der von BERNEIS (12) und WEITZEL (1o2) vermutet wird, und die Tatsache, daß Ibenzmethyzin wachstumshemmenden Formaldehyd im Gewebe entstehen läßt, (1o2), erklärt vielleicht, da mehrere Mechanismen gleichzeitig reagieren können, unser Ibenzmethyzinergebnis.

Sinalost wirkte weniger regelmäßig als Natulan. Neben einer verminderten Reaktion auf die DNS stand eine ebenfalls nur geringe Wirkung auf die RNS. Die Proteinsynthese wurde überhaupt nicht betroffen. Das stimmt mit den meisten Literaturangaben überein. DAVIDSON (25) und TRAMS

et al (1oo) fanden nur eine geringe Hemmung des Einbaus markierter Bausteine in die DNS und RNS durch alkylierende Pharmaka.

Das markanteste zytostatische Ergebnis der gesamten Untersuchungsreihe zeigte Stickstofflost bei einem Retikulosarkom: es verminderte die DNS-Synthese um 89% und die RNS-Synthese um 7o%.

Auffällig war auch der Befund, daß Sinalost bei allen untersuchten Lymphadenosen keinen sicheren Effekt auf die proliferierenden Zellen hatte, während gerade die chronische lymphatische Leukämie therapeutisch mit Lostderivaten relativ gut zu beeinflussen ist (29,51,53).
Die in-vitro-Ergebnisse von Stickstofflost stimmen also nicht immer mit den in-vivo-Befunden überein. Vielleicht liegt diese Diskrepanz daran, daß Sinalost als alkylierende Substanz sehr viele Angriffspunkte in der Zelle hat, so daß die therapeutische Wirkung nicht immer mit einer DNS- oder RNS-Veränderung einhergehen muß. Stickstofflost scheint außerdem vornehmlich in der G^2-Phase des Zellzyklus einzugreifen (4, 78, 79).

Actinomycin C bewirkte in allen untersuchten Fällen mit malignen Lymphomen (3 Lymphogranulomatosen, 3 Retikulosarkome, 1 Lymphadenose) eine sehr gute Hemmung auf die RNS-Synthese (durchschnittlich 5o%ige Senkung) und in 2 Fällen auch auf die Proteinsynthese, Die DNS wurde nur in einem Fall fraglich beeinflußt. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen der Literatur überein. MITCHELL beobachtete, daß bereits bei einer Konzentration von o,5 gamma/ml

der H^3-Uridineinbau in die "blast cells" der lymphatischen Gewebekultur um 3o% vermindert wurde (73). BICKIS et al (13) beschrieben RNS-Synthesehemmung unter Actinomycin an menschlichem Tumorgewebe in vitro. REICH etal (87) und PERRY (82) konnten die selektive RNS-Synthesehemmung an Säugerzellen demonstrieren. Dabei könnte die Hemmung auf dem gleichen Wirkungsmechanismus beruhen, wie das mehrfach bei Mikroorganismen oder tierischen Geweben gezeigt wurde (38,47,58,85): Komplexbildung des Actinomycin mit der DNS und somit RNS-Hemmung, da die gesamte RNS durch Matritzen-DNS synthetisiert wird (3).

Die eindeutigen in-vitro-Befunde stimmen auch mit relativ guten klinischen Erfolgen der Actinomycintherapie bei den lymphoproliferativen Erkrankungen überein (7, 92).

Vinblastin hatte in allen Fällen keinen wesentlichen Effekt, weder im DNS- noch im RNS-Stoffwechsel. Die Veränderungen der Einbauraten schwankten meist um $\pm$ 5%, in 2 Extremfällen zwischen +13% und -24%. Auch in der Literatur werden keine Vinblastineffekte auf die Nukleinsäuresynthese angegeben (14, 19, 54). BICKIS beschrieb jedoch Senkungen der DNS-, RNS- und Proteinsynthese durch extrem hohe Vinblastinkonzentrationen (13). Vinblastin scheint seinen hauptsächlichen zytostatischen Effekt durch eine Hemmung der Mitose in der Metaphase auszuüben (14, 19).Da diese Phase aber, wie oben beschrieben, in der Kurzzeitinkubation nicht erfaßt werden kann, war das Ergebnis zu erwarten.

Prednisolon hatte in unseren Versuchen in normal therapeutischen Dosen keinen Einfluß auf den Einbau der tritiummarkierten DNS- und RNS-Vorläufer, wie das auch für Cortison und Hydrocortison beobachtet wurde (66,1o4). Erst bei 1ooo-facher Konzentration der Ausgangsdosis konnte in drei Fällen eine deutliche Synthesehemmung der DNS und in einem Fall der RNS festgestellt werden. In erster Linie wurde dabei die Markierungsintensität, nicht so sehr der Markierungsindex betroffen.

HUNSTEIN et al (52) beobachteten bei der Einwirkung von Prednisolon auf die H^3-Thymidineinbaurate in Rattenknochenmarkszellen ebenfalls eine Verminderung von markierten Erythrozyten und Leukozyten und deren Vorstufen.

Die Autoren diskutieren den Abfall des Markierungsindex als Ausdruck für eine Herabsetzung der mitotischen Aktivität. Möglich wäre auch eine Verlängerung der Interphase. Das würde eine echte Proliferationshemmung vortäuschen.

Über den genauen Wirkungsmechanismus der Corticosteroide am Nukleinsäurestoffwechsel liegen noch keine sicheren Ergebnisse vor. Aus den Befunden TROWELL's (1o1) und NOWELL's (75) über die Cortisonempfindlichkeit der Lymphozyten kann geschlossen werden, daß diese Hormongruppe in der postmitotischen Ruhephase der Zelle angreift.

V. Der klinische Wert der Kurzzeitinkubation mit zytostatischen Substanzen.

Mit dieser Methode kann eine zytostatische Sensibilitätsprüfung in vitro vor Beginn einer zytostatischen Behandlung durchgeführt werden, um das jeweils optimale Zytostatikum gleich bei Therapiebeginn applizieren zu können. Das setzt allerdings voraus, daß eine weitgehende Übereinstimmung der Effekte in vitro und in vivo besteht. Nach unseren Ergebnissen kann zwar eine absolute Aussage mit dieser Methode nicht gemacht werden, sie erlaubt aber eine orientierende Testung. Auch andere Methoden der Zytostatikaprüfung an Tumorgeweben unter in-vitro-Bedingungen erlauben keine sichere Aussage: BICKIS et al (13) erzielten nach 15o-minütiger Inkubation von Tumorgewebe mit Zytostatika in ca. 1oo-facher Überdosierung in 7 von 9 Fällen eine Übereinstimmung der klinischen Wirkung und der Hemmung der Nuklein- und Proteinsynthese in vitro. WOLBERG (1o5) fand in 13 von 22 Vergleichen unter 1oo- bis 1ooo-facher Überdosis eine Übereinstimmung, WRIGHT et al (1o6) in 71 von 131 Fällen.

Die Ursachen für die Differenzen sind sicher verschiedener Natur und können nur zu einem kleinen Teil erklärt werden: die in-vivo-Verhältnisse können in vitro nicht genau nachvollzogen werden, z.B. rufen zytostatische Substanzen im Zellstoffwechsel sehr verschiedene Reaktionen hervor, die in vitro nicht alle erfaßt werden können.

Zusammenfassend kann gesagt werden: zur Orientierung über die Beeinflußbarkeit lymphoproliferativer Erkrankun-

gen durch Zytostatika ist diese Methode brauchbar. Das beweisen die relativ guten Übereinstimmungen der Testergebnisse mit den Ergebnissen der Klinik und der Literatur.

Ein sicheres Ergebnis der Zytostatikaprüfung in vitro müßte zu erwarten sein, wenn alle Fehlermöglichkeiten ausgeschaltet und alle Phasen des Zellzyklus erfaßt werden könnten.

E. Zusammenfassung

26 frisch exstirpierte Lymphknoten von Patienten mit lymphoproliferativen Erkrankungen (8 Lymphogranulomatosen, 5 Retikulosarkome, 4 Lymphadenosen, 9 Hyperplasien) wurden nach 1-stündiger Inkubation in Serum-Ringer-Glukoselösung bei 37°C und ständiger Rotation mit Hilfe von tritiummarkierten DNS-, RNS- und Proteinbausteinen auf ihre zytostatische Empfindlichkeit geprüft.
Folgende Zytostatika wurden verwendet: Ibenzmethyzin (Natulan), Stickstofflost (Sinalost), Actinomycin C (Sanamycin), Prednisolon (Decortin H).

Ibenzmethyzin bewirkte in 14 von 22 Fällen vor allem eine Hemmung der DNS-, weniger der RNS- und am undeutlichsten der Proteinsynthese.
Stickstofflost senkte in 6 von 19 Fällen die DNS-Synthese, die RNS-Synthese wurde nur gering und die Proteinsynthese überhaupt nicht beeinflußt.
Actinomycin C reduzierte in allen untersuchten 7 Fällen selektiv die RNS-Synthese und in 2 Fällen auch die Proteinsynthese. Der DNS-Stoffwechsel blieb unbeeinflußt.
Prednisolon hatte in niedrigen, therapeutischen Dosen keinen Effekt. Hohe Konzentrationen bewirkten eine Reduzierung der Nukleinsäuresynthese,
Vinblastin bewirkte als bekanntes Mitosegift keine Verminderung des H^3-Nukleosid- und H^3-Aminosäureeinbaus.

Die Lymphogranulomatosen reagierten auf die verwendeten zytostatischen Substanzen am ausgeprägtesten.

Weniger, aber doch deutlich, wurden die Retikulosarkome und Lymphadenosen beeinflußt. Die reaktiven Lymphknotenhyperplasien zeigten praktisch keine Empfindlichkeit.

Einige in-vitro-Ergebnisse konnten mit Therapieversuchen verglichen werden. Von 14 vergleichbaren Fällen zeigten 9 eine gute Übereinstimmung in vitro und in vivo: in 7 Fällen bewirkten die Zytostatika sowohl in vitro als auch in vivo eine Hemmung des H^3-Nukleosideinbaus bzw. eine Verkleinerung der Lymphome, in 2 Fällen blieben die zytostatischen Medikamente in vitro und in vivo wirkungslos. 3 Fälle zeigten eine fragliche und 2 Fälle überhaupt keine Übereinstimmung.

Auf Grund der Ergebnisse kann gesagt werden, daß diese Methode zur orientierenden Zytostatikaprüfung geeignet erscheint.

Herrn Professor Dr.med.H.Begemann, Chefarzt der I. Medizinischen Abteilung des städtischen Krankenhauses München Schwabing, spreche ich für die Überlassung der Arbeit meinen herzlichen Dank aus.

Herrn Dr.med.Trepel und Herrn Dr.med.Rastetter danke ich vielmals für ihre technische Hilfe und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der Präparate.

Weiterhin danke ich den pharmazeutischen Firmen
Deutsche Hoffmann La Roche, Grenzach/Baden,
Nordmark-Werke, Uetersen/Holstein,
Eli-Lilly Gmbh, Giessen,
Farbenfarbriken Bayer AG, Leverkusen
Merck AG, Darmstadt,
für die großzügige Bereitstellung der Medikamente.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAIR, F.E., BAGG, H.J.: Experimental and clinical studies on the treatment of cancer by dichlorethylsulfide. Ann. Surg. 93, 190 - 199 (1931).

2. ADLER, J.J.R. and LEHMANN, M, J,: Enzymatic synthesis of DNA. IV. Linkage of single deoxynukleotides to the deoxynucleoide ends of DNA. Proc. nat. Acad. Sci. 44, 641 - 647 (1958).

3. ALLFREY, V.G. and MIRSKY, A.E.: Evidence for the complete DNA dependence of RNA synthesis in isolated calf thymus nuclei. Proc. nat. Acad. Sci. 48, 1590 - 1592 (1962).

4. ASTALDI, G., STROSSELLI, E., PISANI, A.: Effects of radimimetic agents on the kinetic of mitosis. Proc. VIII th Internat. Congr. Hematol. Tokyo, 1960, 504 - 510.

5. AUERBACH, C., ROBSON, J.M.: chemical production of mutations. Nature 157, 302 -305 (1946).

6. BASERGA, R., HENEGAR, G.C., KISIALESKY, W.E., LISCHE, H.: Uptake of tritiated thymidine by human tumor in vivo. Lab. Invest. 11, 360 - 363 (1962).

7. BEGEMANN, H.: Clinical experience with actinomycin C. Ann. N.Y. Acad. Sci. 89, 454 - 462 (1960).

8. BEGEMANN, H. und FELLMER, K.E.: Zur Problematik der zytostatischen Therapie. Med. Klin. 60, 1681 - 1686 (1965).

9. BEGEMANN, H., BLUM, K.-U., DREWS, J., FELLMER, K.E., FÖLSCH, E. GERHARTZ, H., GRUNZE, H., HAUSMANN, K., HENNES, R., JÜNGLING, W. KLEIBEL, F., KÖRTGE, P., MARING, H., MARTIN, H, OBRECHT, P., OSTEN, W., PABST, H.W., POLIWODA, H., SCHUBERT, J.C.F., SEIDL, S. SPECHTER, H.-J., STRICKSTOCK, K.-H., WITTE, S.: Ergebnisse der klinischen Prüfung einer neuen zytostatischen Substanz aus der Methylhydrazinreihe (Natulan). Med. Klin. 60. 960-964 (1965).

10. BELTZ, R.E., van LANCKER, J., POTTER, V.R.: Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. IV. The effect of x-radiation of the whole body on nucleic acid synthesis in vivo. Cancer Res. 17, 688 -697, (1957).

11. BERNEIS, K., KOFLER, M., BOLLAG, W., KAISER, A., LANGEMANN, A.: The degradation of deoxyribonucleic acid by new tumor inhibiting compounds: the intermediate formation of hydrogen peroxide. Experimentia 19, 132 -133 (1963).

12. BERNEIS, K., KOFLER, M., BOLLAG, W., ZELLER, P., KAISER, A., LANGEMANN, A.,: Der pro-oxydative Effekt tumorhemmender Methylhydrazin-Verbindungen. Helv. chim. Acta 46, 2157 -2167 (1963).

13. BICKIS, I.J., HENDERSON, I.W.D., and QUASTEL, J.H.: Biochemical studies of human tumors. II: In vitro estimation of individual tumor sensivity to anticancer agents.
Cancer 19, 1o3 -113 (1966).

14. BOGGS, D.R., ATHENS, J.W., RAAB, O.P., CANCILLA, P.A., RAAB, S.O., CARTWRIGHT, G.E. and WINTROBE, M.M.: Leukokinetic studies VII. Morphology of the bone marrow and blood of dogs given vinblastine sulfate.
Blood 23, 53 - 67 (1964).

15. BOYD, G.A., BOARD, F.A.: Preliminary report on histochemography.
Science N.Y. 11o, 586 -588 (1949).

16. BOYD, G.A.: Autoradiography in biology and medicine.
Academy Press, New York 1958.

17. BROCK, N.: Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika.
Arzneim.Forsch. 8, 1 - 9, (1958).

18. BROCKMANN, H.: Die Actinomycine.
Fortschr.chem.orga.Naturstoffe 18, 1-54, (196o).

19. BRUCHOVSKY, N., OWEN, A.A., BECKER, A.J. and TILL, J.E.: Effects of vinblastine on the proliferative capacity of L - cells and their progress through the division cycle.
Cancer Res. 25, 1232 -1237, (1965).

2o. BRNNER, K.W.: Grundsätze der chemotherapeutischen Behandlung der Krebskrankheiten.
Schweiz. med. Wschr. 95, 789, (1965).

21. CLARKSON, B., OTA, K., OHKITA, T. and O'CONNOR, A.: Kinetics of proliferation of cancer cells in neoplastic effusions in man.
Cancer 18, 1189 - 1213 (1965).

22. COBB, J.P., WALKER, D.G. and WRIGHT, J.C.: Comparative chemotherapy studies on primary short-term cultures of human normal, benign and malignant tumor tissues.
Cancer Res. 21, 583 - 59o, (1961).

23. CONRAD, M., E.jr. and CROSSBY, W.H.: Massive nitrogen mustard therapy in Hodgkin's disease with protection of bonemarrow by tourniquets.
Blood 16, 1o89 - 11o3, (196o).

24. CUTTS, J.H.: the effect of vinealeucoblastineon dividing cells in vivo.
Cancer Res. 21, 168 - 172 (1961).

25. DAVIDSON, J.D., FREEMAN, B.B.: The effects of antitumor drugs upon P^{32}- incorporation into nucleic acids of mouse tumors.
Cancer Res. 15, 31 - 37 (1955)

26. DREW, R.M.: zit.bei FEINENDEGEN et al.
Exp. Cell. Res. 22, 381 - 4o5, (1961)-

27. ELVES, M.W., GOUGH, I., ISRAEL, U.C.G.: The place of the lymphocyte in the Reticulo-endothelial System: a study on the in vitro effect of prednisolone on lymphocytes.
Acta haemat. 32, 1oo - 1o7 (1964).

28.EVENSEN,A. and IVERSEN,O.H.: Rate of cell proliferation in a mouse squamous cell carcinoma.
Nature (London) 196, 383 - 384 (1962).

29.FAIRLEY,G.H.,PATTERSON, M.I.L. and SCOTT,R.B.: Chemotherapy of Hodgkin's disease with cyclophosphamide, vinblastine and procarbacine.
Brit.Med.J. 1966/II, 75 -78.

3o.FEINENDEGEN,L.E.,BOND,V.P.,PAINTER,R.B.: Studies on the relationship of RNA-synthesis, Dna-synthesis and precursor pool in human tissue culture cells studied with tritiated thymidine nucleosides.
ExpeCell.Res. 22, 381 - 4o5, (1961).

31.FLIEDNER,T.M.,: Persönliche Mitteilung.

32.FOLEY,G.E.,FRIEDMAN,O.M.,DROLET,B.P.:Studies on the mechanism of action of cytoxan.Evidence of activation in vivo and in vitro.
Cancer Res. 21, 57-63 (1961).

33.FÖLSCH,E.,DREWS,J.,GRUNZE,H.: Über die Wirkung eines neuen Zytostatikums (ro 4- 6467) auf den Einbau markierten Glycins in Tumorzellen.
Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 7o, 995 - 998, (1964).

34.FRAENKEL - CONRAT,H.: Chemical modification of viral ribonucleic acid. I. alkylating agents.
Biochim.biophys.Acta 49, 169 - 18o, (1961).

35.FRIEDKIN,M.,WOOD,H.: Utilization of thymidine C^{14} by bone marrow cells and isolated thymus nuclei.
J.biol.Chem.22o, 639 - 651, (1956).

36.GERHARTZ,H.: Chemotherapie der Hämoblastosen und bösartigen Geschwülste.
Fortschr.Mediz. 81, 6o7 - 616 (1963).

37.GILMAN,A.,PHILIPS,F.S.: The biological actions and therapeutic applications of the beta-chlorethylamines and sulfides.
Science N.Y. 1o3, 4o9 - 415 (1946).

38.GOLDBERG,I.H., and RABINOWITZ,M.: Actinomycin D inhibition of deoxyribonucleic acid - dependent synthesis of ribonucleic acid.
Science,136, 315 - 316 , (1962).

39.GOLDECK,H.: Die N-Lost-Behandlung der Hämoblastosen.
Ärztl.Forschg. 3/15, 39o - 4oo.

4o.GROSS,R., BOCK,H.E.: Die Chemotherapie der Tumorleiden in: Klinik der Gegenwart, München-Berlinwien.

41,GRUNDMANN,E.: Experimentelle Untersuchungen über die funktionelle Zytomorphologie der lymphatischen Strukturen bei Entzündung sowie unter Cortison und Doca.
Beitr.zur path.Anat. u. allg.Path. 119, 377 - 432(1958).

42. HACKMANN,C.: Untersuchungen über den Einfluß des Sanamycins (Actinomucin C) auf tierische Organe: Milz, Thymus, Lymphknoten, Nebennieren,und Keimdrüsen. Z.Krebsforsch.6o,25o - 255 (1954).

43. HACKMANN,C.: HBF 386,(Actinomycin C) ein zytostatisch wirksamer Naturstoff. Strahlentherapie 9o, 296 - 3oo (1953).

44. HARBERS,E.: Autoradiographie als histochemisches Untersuchungsverfahren. in:Handbuch der Histochemie,I. Fischer,Stuttgart 1958.

45. HARBERS,E.: Autoradiographie. in:Schwiegk,H. und Turba,W.: Künstliche Radioisotope in Physiologie, Diagnostik und Therapie, I,Springer, Berlin 1961.

46. HARBERS,E.: Die Nukleinsäuren. Thieme, Stuttgart 1964.

47. Harbers,E.; BUJARD,H.,MÜLLER? W.:Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus der Actinomycine. IV. In-vivo-Versuche mit C^{14}-markiertem Actinomycin C. III.Internat.Symp. für Chemother. Stuttgart 1963, Thieme, Stuttgart 1964.

48. HARBERS,E.,MÜLLER,W.:On the inhibition of RNA-synthesis by actinomycin. Biochem.biophys.Res.Commun.7, 1o7 - 11o (1962).

49. HARBERS,E. und HEIDELBERGER,C.: Studies on nucleic acid biosynthesis in Ehrlich ascites cells suspended in a medium permitting growth. J.biol.chem.234, 1249 - 1254 (1959).

5o. HAYHOE,F.G.J.,QUAGLINO,D.:Autoradiographic investigations of RNA and DNA metabolism of human leucocytes cultured with phytohaemagglutinin; uridine-5-H^3 as a specific precursor of RNA. Nature 2o5, 151 (1965).

51. HEILMEYER,L.:Der gegenwärtige Stand der Chemotherapie der Neoplasien. Med.Klin.6o, 649 (1965).

52. HUNSTEIN,W. und STREY,M.:Zur Wirkung von Prednisolon auf die H^3-Thymidin-Einbaurate in Knochenmarkszellen von Ratten. Klin. Wschr.43,52 - 54 (1965).

53. JACOBSON,L.O.,SPURR,C.L.,GUNZMAN-BARRON,E.S.,SMITH,T. LUSHBAUGH,C. and DICK,G.F.: Nitrogen mustard therapy. J.Amer.Med.Ass.132,263 - 271 (1946).

54. JOHNSON,J.S., ARMSTRONG,J.G.,GORMAN,M.,BURNETT,J.P.jr. The vinca alkaloids: A new class of oncolytic agents. Cancer Res. 23, 1390 - 1427 (1963).

55.JOHNSON,H.A.,BOND,V.P.: A method of labeling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cellproliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of human breast. Cancer 14, 639 - 643 (1961).

56.JOHNSON,H.A. and CRONKITE,E.P.: the effect of tritiated thymidine on mouse spermatogonia. Radiat.Res. 11, 825 - 831 (1959).

57.JORES,A. und GOLDECK,H.: Klinische Erfahrungen mit der Stickstofflost-Therapie. Ther.Gegenwart 88/89, 86 - 9o (1949/5o).

58.KERSTEN,W.,KERSTEN,H.,RAUEN,H.M.: Action of nucleic acids on the inhibition of growth by actinomycin of neurospora crassa. Nature 187, 6o - 61 (196o).

59.KILLANDER,D. and ZETTERBERG,A.: Quantitative cytochemical studies on interphase growth. Exp.Cell.Res. 38, 272 - 284 (1965).

6o.KIT,S.,GUZMAN-BARRON,E.S.: The effect of adrenal cortical hormones on the incorporation of C^{14} into the protein of lymphatic cells. Endocrinology 52,1 -11 (1953).

61.LAJTHA,L.G.,OLIVER,R. and ELLIS,F.: Incorporation of P^{32} and adenine C^{14} into DNA by human bone marrow cells in vitro. Brit.J.Cancer 8, 367 - 379 (1954).

62.LALA,P.K.,MALONEY,M.A. and PATT,H.M.: Measurment of DNA-synthesis time in myeloid-erythroid precursors. Exp.Cell Res. 38, 626 - 634 (1965).

63.LAWLEY,P.D.: Relative reactivites of deoxyribonucleotides and of the bases of deoxyribonucleic acid towards alkylating agents. Biochim.biophys.Acta 26, 45o -451 (1957).

64.LAWLEY,P.D.: Hydrolysis of methylated deoxy-guanylic acid at pH 7 to yield 7-methylguanine. Proc.chem.Soc. 29o - 293 (1957).

65.LENNERT,K.: Lymphknoten. Diagnostik in Schnitt und Ausstrich; Cytologie und Lymphadenitis. Handbuch spez.Path.Anat.Hist.I. Band /III. Band-Teil A. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1961.

66.Le PAGE, G.A. and GREENLEES,I.L.: Incorporation of glycine-2-C^{14} into ascites tumor cell purines as a biological test system. Cancer Res. 15, Suppl.3, 1o2 - 1o5 (1955).

67. LIMBURG,H. und KRAHE,M.:Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Zytostatika. Dtsch.med.Wschr. 89, 1938 -1946 (1964).

68. LINKE,A.: Grenzen und Möglichkeiten einer Chemotherapie der Hämoblastosen und malignen Tumoren. Regensb. Jb. ärztl. Fortbild. 12, 196 - 2o2 (1964).

69. LISS,E. und PALME,G.: Die Hemmung des Einbaues von P^{32} in die DNS durch Endoxan. Naturwissenschaften 5o, 336 - 337 (1963).

7o. LÖHR,G.E.: Vergleichende Untersuchungen über die Hemmung der Phosphoglyzeraldehyddehydrogenase durch verschiedene zytostatische Substanzen. Klin. Wschr. 35, 1163 - 1166 (1957).

71. MALKIN,H.M.: Incorporation of glycine-2-C^{14} and adenine 4-6-C^{14} into the DNA of mature sea urchin sperm. Biochim. biophys. Acta 12, 585 - 586 (1953)

72. MATHE,G.,SCHWEISGUT,O.,SCHNEIDER,M.,AMIEL,I.L., BERUMEN,L.,BRULE,G.,CATTAN,A. and SCHWARZENBERG,W.: Methylhydrazine in treatment of Hodgkin's disease and various forms haematosarcoma and leukaemia. Lancet 1963/II, 1o77 -1o79.

73. MITCHELL,J.: Autoradiographic studies of nucleic acid and protein metabolism in lymphoid cells. Aust. J. exp. Biol. Med. Sci. 42, 363 - 371 (1964)

74. MÜLLER,W.: Bindung von Actinomycinenund Derivaten an Desoxyribonukleinsäure. Naturwissenschaften 49, 156 - 157 (1962).

75. NOWELL,P.C.: Inhibition of human leucocyte mitosis by prednisolone in vitro. Cancer Res. 21, 1518 - 1521 (1961).

76. OEHLERT,W.,DÖRNER,P. und LESCH,R.: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese in überlebendem Tumorgewebe des Menschen. Beitr. path. Anat. 128, 468 - 48o (1963).

77. PAINTER,R.D.,DREW,R.M.: Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in human cancer cell cultures(HeLa). Lab. Invest. 8, 278 - 285 (1959).

78. PALME,G, und LISS,E.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Cyclophosphamid (Endoxan) auf die DNS-Synthese proliferierender Zellsysteme der Maus. Klin. Wschr. 41, 291 - 292 (1963).

9. PALME,G,,LISS,E. und WIEBEL,F.: Autoradiographische Untersuchungen über das Verhalten einzelner Interphaseabschnitte des Dünndarmepithels der Maus unter der Einwirkung von Cyclophosphamid (Endoxan). Naturwissenschaften 51, 197 -198 (1964)

8o. PAPAC,R.J.: Effects of alkylating agents on nucleic acid metabolism of cultured human cells.
Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 3, 35o-351 (1962).

81. PELC,S.R.: The stripping-film technique of autoradiography.
Int. J. appl. Radiat. 1, 172 - 177 (1956).

82. PERRY,R.P.: Selective effects of actinomycin D on the intranuclear distribution of ribonucleic acid synthesis in tissue culture cells.
Exp. Cell. Res. 29, 4oo -4o1 (1963).

83. PRESCOTT,D.M.: RNA and protein replacement in the nucleus during growth and division and the conservation of components in the chromosomes,
in: HARRIS,R.J.C. ed. Cell growth and cell division.
New York 1963, 111 - 128.

84. PÜTTER,J.: in: HOLDER,E.,MEYTHALER,F. und DU MESNIL de ROCHEMONT,R.: Therapie maligner Tumoren,Hämoblastome und Hämoblastosen.
BandI. Pathologie und Chemotherapie. Stuttgart 1966.

85. RAUEN,H.M.,KERSTEN,H,,KERSTEN,W.: Zur Wirkungsweise von Actinomycin.
Z. physiol. chem. 321, 139 - 147 (196o).

86. REICH,E.: Biochemistry of actinomycins.
Cancer Res. 23, 1428 - 1441 (1963).

87. REICH,E.,FRANKLIN,R.M.,SCHATKIN,A.J.,TATUM,E.L.: Action of actinomycin D on animal cells and viruses.
Proc. nat. Acad. Sci. 48, 1238 - 1241 (1962).

88. RUBINI,J.R.,KELLER,S.,CROKITE,E.P.: In vitro DNA labeling of bone marrow and leukemic blood leucocytes with tritiated thymidine. I. Physical and chemical factors with affekt autoradiographic cell labeling.
J. Lab. Clin. Med. (St. Louis) 66, 483 - 492 (1965).

89. RUTMAN,R.J.: The effect of alkylating on DNA synthesis in vitro.
in: WILMANNS,H.: Chemotherapie maligner Tumoren,
Stuttgart 1964, 151 - 156.

9o. RÜTISHAUSER,A.,BOLLAG,W.:Cytological investigations with a new class of cytotoxic agents: methylhydrazine derivates.
Experimentia 19, 131 - 132 (1963).

91. SAFIER,S.,WAGNER,H.P.,COTTIER,H.,RAI,K.,JANSEN,C. and CRONKITE,E.P.: Evidence for lymphoid cell lines with different generation times in the thoracic duct of the calf.
Conference on Germinal Centers of Lymphatic Tissue, June 1966, Bern, 22 - 24.

92.SCHULTE,G. und LINGS,H.: Erfahrungen mit neuen zytostatischen Mitteln bei Leukosen und Lymphogranulomatosen und die Abgrenzung ihrer Wirkungen gegen Röntgentherapie.
Strahlentherapie 9o, 3o1 - 3o6 (1953).

93.SCHWARZ,R.S.: Immunosuppressive drugs.
Progr. Allergy 9, 246 - 3o3 (1965).

94.SÖLTZ-SZÖTZ,J.: Zellkulturuntersuchungen zur Melanomtherapie.
Wien. med. Wschr. 113, 8o2 - 8o4 (1963).

95.STEFANI,S.: Old-tuberculin-induced radioresistance on human lymphocytes in vitro.
Brit. J. Haemat. 12, 345 - 35o (1966).

96.STEFANI,S. and SCHRER,R.: In vitro effect of phytohemagglutinin on the sensitivity of human lymphocytes to nitrogen mustard.
J. Lab. Clin. Med. 63, 1o27 - 1o32 (1964).

97.STRYCKMANS,P.,CRONKITE,E.P. and FLIEDNER,T.M.: DNA synthesis time of erythropoetic and granulopoetic cells in human beings.
Schweiz. med. Wschr. 96, 1278 - 1279 (1966).

98.TAYLOR,H.,WOODS,P.S. and HUGHES,W.L.:The organisation and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritiumlabelled thymidine,
Proc. nat. Acad. Sci. 43, 122 - 127 (1957).

99.THEML,H.: Inauguraldissertation, München 1967.

1oo.TRAMS,E.G.,NADKARNI,M,V.,SMITH,P.K.: On the mechanism of action of alkylating agents. I. Interaction of alkylating agents with nucleic acids.
Cancer Res. 21, 56o - 566 (1961).

1o1.TROWELL,O.A.: The action of cortisone on lymphocytes in vitro.
J. Physiol. 119, 274 - 275 (1953).

1o2.WEITZEL,G.,SCHNEIDER,F. und FRETZDORFF,A.-M.:Zytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine.
Experimentia 2o, 38 - 39 (1964).

1o3.WILMANNS,W.: Indikation zur Behandlung akuter Leukämien mit 6-Mercaptopurin auf biochemischer Grundlage.
Dtsch. med. Wschr. 88, 9oo -9o1 (1963).

1o4.WINZLER,R.J.,WELLS,W.,SKAPIRA,J.,WILLIAMS,A.D., BORNSTEIN,I.,BURR,M.J. and BEST,W.R.: Metabolism of human leukocytes in vitro. II. The effect of several agents on the incorporation of radioactive formate and glycine.
Cancer Res, 19, 377 - 387 (1959).

105. WOLBERG, W.H. and BROWN, R.R.: Autoradigraphic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue.
Cancer Res. 22, 1113 - 1119 (1962).

106. WRIGHT, J.C., COBB, I.P., GUMPORT, S.L., SAFADI, D., WALKER, D.G. and GOLOMB, F.M.: Fursher investigations of the relation between the clinical and the tissue culture response to the chemotherapeutic agents for human cancer.
Cancer 15, 284 - 293 (1962).

107. WINTROBE, M.M. and HUGULEY, C.M. jr.: Nitrogen Mustard Therapy for Hodgkin's Disease, Lymphosarkoma, the Leucemias and other Disorders,
Cancer 1, 357 - 358 (1948).

Lebenslauf

Am 8. Januar 1941 wurde ich als 2. Kind des Arztes Dr.med.habil. Paul Stockhusen und seiner Ehefrau Inge, geb. Galle, in Jena/Saale geboren.
1946 zogen wir nach Eisenach um, wo sich mein Vater als Facharzt für Augenkrankheiten niederließ.
Von 1947 bis 1959 besuchte ich die Schule in Eisenach und legte am 1o.6.1959 am altsprachlichen Zweig der Ernst-Abbe-Oberschule die Reifeprüfung ab.
Von 1959 bis 196o studierte ich in Jena Medizin, siedelte im April 196o mit meinen Eltern in die Bundesrepublik über, bestand in Waldbröhl die Sonderprüfung für SBZ-Abiturienten und begann erneut das Medizinstudium in Marburg/Lahn. 1963 bestand ich dort das Physikum, ging für 1 Semester nach München und Kiel und kehrte im WS 1964/65 wieder nach München zurück. Hier legte ich am 14. Februar 1967 das medizinische Staatsexamen ab.
Seit Mai 1967 bin ich als Medizinalassistent an der inneren Abteilung der Städt. Krankenanstalten Düren tätig.